GELCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR HETEROGENITÄT VON GASTRIN

Ernst Birkmeier

Diss. München
1984

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. E. Buchborn

GELCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR HETEROGENITÄT VON GASTRIN

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ernst Birkmeier
aus
München

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. W. Londong
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. E. Buchborn
Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.1984

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. AUFGABENSTELLUNG	6
C. METHODIK	8
1. Gelchromatographie	8
a) Säulenherstellung	9
b) Auswertung	11
c) Trennleistung	11
d) Eichung der Chromatographiesäule	13
e) Darstellung der Ergebnisse	13
2. Radioimmunoassay	14
a) Herstellung des Tracers	14
b) Standardverdünnungsreihe	14
c) Spezifisches Antiserum	15
d) 2. Antikörper	15
e) Auswertung	16
f) Modifizierung des Radioimmunoassays	16
g) Gamma-Globulin-Titer	19
h) Einfluß von Natriumchlorid und Serumalbumin auf die Antigen-/Antikörperbindung	19
i) Immunoidentität von Gastrin der Ratte und synthetischem Humangastrin	20
3. Trinktest und Blutentnahme	21
4. Untersuchungsmaterial	22
a) Gesunde Probanden	22
b) Patientenkollektive	22
c) Serum- und Gewebsgastrin der Ratte	23

Seite

D. ERGEBNISSE 24

1. Methodik des Radioimmunoassays 24
a) Inkubationszeit und Antikörperkonzentration 24
b) Optimierung des Gammglobulintiters 27
c) Unspezifische Interferenz von Natrium-chlorid und Albumin auf die Bindungsrate 28

2. Heterogenität von Serumgastrin 30
a) Gastrinkomponenten bei atrophischer Gastritis 30
b) Zollinger-Ellison-Syndrom 32
c) Serumgastrinkomponenten beim Normalkollektiv 36
d) Gastrinkomponenten bei Ulcus duodeni 38
e) 40
f) Antrale G-Zellhyperplasie 46
g) Gastrinkomponenten bei chronischer Nieren-insuffizienz 48

3. Gastrinkomponenten im Serum und gastrointestinaler Mukosa bei der Ratte 50
a) Immunoidentität von synthetischem Humangastrin und Gewebegastrin der Ratte 50
b) Einfluß von Streß und/oder Vagotomie auf Serumgastrin 52
c) Gastrinkomponenten in der gastrointestinalen Mukosa bei Ratten 55

E. DISKUSSION 63

F. ZUSAMMENFASSUNG 83

G. LITERATURVERZEICHNIS 85

A. EINLEITUNG

Nach Einführung radioimmunologischer Methoden zur Gastrinbestimmung konnte die molekulare Heterogenität dieses Peptithormones nachgewiesen werden. Das zuerst von Gregory und Tracy aus Gewebeextrakten isolierte Gastrinmolekül besteht aus 17 Aminosäuren, es wurde "little gastrin" genannte(41). Mit Hilfe chromatographischer Techniken konnten Yalow und Berson ein größeres Gastrinmolekül nachweisen (big gastrin), dessen Anzahl der Aminosäuren mit 34 angegeben wird (40, 41, 89, 125, 126). Aus Gewebeextrakten eines Gastrinoms ließ sich schließlich eine kleine Gastrinkomponente mit 14 Aminosäuren isolieren (43). Schließlich beschrieben Rehfeld et al. ein Molekül in der Größenordnung von Proinsulin mit gastrinähnlicher Immunreaktivität, das sie "Component I" benannten (89, 91). Diesen Komponenten gemeinsam ist ein biologisch aktives Zentrum, das durch die C-terminale Vierersequenz determiniert ist (42, 83). Durch Inkubation mit Trypsin werden die größeren Gastrinkomponenten in Gastrin-17 bzw. Gastrin-14 gespalten(89).

Einige Jahre lang diskutierte man die Existenz einer makromolekulären Gastrinkomponente, die im Nüchternserum die dominierende Komponente sein sollte (124, 125). Zwar konnte man in Tumorextrakten tatsächlich eine solche makromolekuläre Gastrinkomponente identifizieren - man gab ihr den Namen "big, big-gastrin" - , jedoch scheint im Serum ihre Existenz nur durch eine unspezifische Interferenz der Serum-Albumine vorgetäuscht zu sein (96).

Die Heterogenität von Gastrin ist jedoch noch umfassender. Sehr früh fand man, daß sowohl "little"- und "mini-Gastrin" in einer sulfatierten und nicht sulfatierten Variante vorkommen (41, 43). Durch "high resolution" Gelchromatographie und Ionenaustausch-Chromatographie fand man, daß "Component I" und "big-gastrin" in jeweils 6 Unterformen, "little"- und "mini-gastrin" in je vier Unterformen vorliegen (41, 93, 95).

Außerdem fand man in jüngster Zeit in Mukosaextrakten aus Antrum und Duodenum Fragmente des Gastrinmoleküls. Es konnte ein Tetrapeptid identisch mit dem biologisch aktiven Zentrum und ein Tridekapeptid, das dem N-terminalen Ende von Gastrin-17 entspricht, isoliert werden (32, 88). Die eigentlich biologisch aktive Komponente ist Gastrin-14, auf molarer Basis hat Gastrin-34 nur 1/6 der Wirkung (114). Dafür ist die Halbwertszeit von Gastrin-34 mit ca. 42 Minuten ca. siebenmal länger als von Gastrin-17 (114, 116). In der Antrummukosa besteht die Gastrinimmunreaktivität zu 95 % aus Gastrin-17, der Rest verteilt sich auf Gastrin-34 und Gastrin 14, "Component I" ist im Gewebe nur in Spuren nachweisbar.
Die Gastrinkonzentration im Duodenum sinkt distalwärts vom Bulbus ab. Im Bulbus beträgt die Gastrinkonzentration nur noch ca. 10 % des Magenantrum. Der Anteil von Gastrin-34 beträgt hier jedoch ca. 60 %. (97).

Gastrin wird vorwiegend in der Mukosa des Magenantrums in endokrinen Zellen gebildet. Diese sogenannten G-Zellen lassen sich mikroskopisch durch Silberimpragnation oder durch Immunofluoreszenzmethoden darstellen. Im Elektronenmikroskop sind sie von pyramidenartiger Gestalt und enthalten Sekretgranula. Sie stehen durch Mikrovilli mit dem Magenlumen in Verbindung (116, 118). Fast alle endokrinen Zellen des Gastrointestinaltraktes zählen auf Grund gemeinsamer ultrastruktureller und zytochemischer Merkmale zur APUD-Reihe. (84) Das Akronym "APUD" beschreibt deren wichtigste Eigenschaft, zirkulierende biogene Amine aufzunehmen, zu speichern und zu dekarboxylieren. (Amine Content and/or Amine Precursor Uptake and Decarboxylation). Nach dem Konzent von Pearse haben diese Zellen einen gemeinsamen embryonalen Ursprung in Neuroektoderm. Die ursprünglich neurale Funktion dieser Zellen wurde während der Ontogenese in eine vorwiegend endokrine Funktion umgewandelt (84).

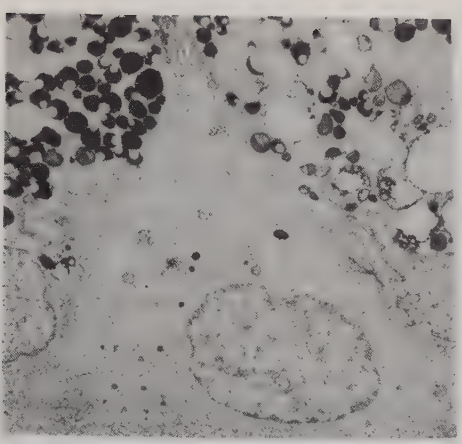

Abb. 1: Elektronenmikroskopisches Bild einer antralen G-Zelle mit Vesikeln und Mikrovilli.

Gastrin wird über eine vagale Stimulation freigesetzt, die im Tierexperiment durch Scheinfütterung oder durch Insulinhypoglykämie erfolgt. Durch Gabe von Atropin ist dieser Effekt supprimierbar. (44, 93, 98, 115, 121) Durch intraoperative elektrische Reizung des N. Vagus läßt sich ebenfalls eine Gastrinliberation beim Menschen herbeiführen. (116, 118). Die G-Zelle reagiert aber auch auf adrenerge Stimuli. (13, 14, 18). Der adäquate physiologische Reiz für die Gastrinfreisetzung ist der Kontakt von Nahrung mit der Magenwand. Experimentell fand man, daß Proteinspaltprodukte und einige Aminosäuren den stärksten Stimulus darstellen (116). Eine mechanische Dehnung der Magenwand scheint nur im Tierversuch zu einer Gastrinsekretion zu führen (76). Eine kurzzeitige Erhöhung des intraantralen pH führt zu keiner Gastrinsekretion, erst bei einer langdauernden Hypo- oder Achlorhydrie resultiert eine erhöhte periphere Gastrinkonzentration (116). Die Regulation der Gastrinsekretion erfolgt durch eine einfache negative Rückkopplung über die Magensäure. Ein niedriger pH im Magen

unterdrückt jede weitere Gastrinfreisetzung. Die Rolle gastrinantagonistischer Hormone wie Sekretin, GIP, VIP und Somatostatin unter physiologischen Bedingungen ist nocht nicht geklärt.

Auf Grund erhöhter Serum-Gastrin-Konzentrationen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz vermutete man im Nierenparenchym die Lokalisation des Gastrinmetabolismus. Tierexperimentell konnte eine Verlängerung der Halbwertszeit von Gastrin nach Nephrektomie gezeigt werden. Nach Stimulation ließ sich eine arterio-venöse Differenz an der Niere auch beim Menschen messen, jedoch fand man im basalen Zustand keine Differenz (19, 23, 47, 49, 60, 80). Auch nach ausgedehnter Dünndarmresektion findet man beim sogenannten short-bowel-syndrome erhöhte periphere Gastrinkonzentrationen als Indiz für einen intestinalen Abbau (106). In Tierexperimenten ließ sich über allen größeren Kapillargefäßgebieten eine arterio-venöse Differenz messen (108, 109). Dagegen fand man in einer neueren Arbeit jedoch beim Menschen im basalen Zustand über keinem Organ eine arterio-venöse Differenz. Die Autoren nehmen somit einen ubiquitären Katabolismus an (85).

Der primäre Effekt von Gastrin auf den Verdauungsvorgang besteht in einer starken Stimulation der Magensäuresekretion, seine Wirkung auf die Pepsin-Sekretion ist bedeutend schwächer. Unter physiologischen Bedingungen erhöht Gastrin den Blutfluß durch die Magenmukosa und wirkt trophisch auf Magen- und Dünndarmmukosa. (29, 112, 116). Eine pharmakologische Dosis stimuliert die Wasser- und Elektrolytsekretion und verstärkt die Peristaltik im Magen, Dünndarm und Gallenblase. Auch der Tonus des unteren Oesophagussphinkters wird erst bei einer unphysiologisch hohen Dosis erhöht (44).

Die klinische Bedeutung der radioimmunologischen Serumgastrinbestimmung besteht darin, daß eine sichere Abgrenzung der normogastrinämischen Ulkuskrankheit von den sicherlich seltenen Fällen einer endokrinen, hypergastrinämischen

Ursache rezidivierender Ulzera möglich ist. (68).
Zur weiteren Differentialdiagnose einer Hypergastrinämie können Provokationstests (standardisierte Testmahlzeit, Calcium-, Sekretin- und Glucagon-Stimulation) beitragen (7, 8, 9,10). Diese Abklärung ist für die weitere adäquate chirurgische Therapie notwendig. (71)

B. Aufgabenstellung

1. In der vorliegenden Arbeit soll die molekuläre Heterogenität von Gastrin untersucht werden. Dazu muß die Methode der Gelchromatographie erarbeitet werden. Die Bestimmung der Gastrinkonzentrationen erfolgt durch einen Radioimmunoassay, dessen Meßempfindlichkeit verbessert werden sollte.

2. Die Gastrinkomponenten im Serum von Patienten mit Ulcus duodeni und im Serum magengesunder Probanden sollen bestimmt werden. Die Fragestellung ist, ob bei Ulcus duodeni Patienten im Komponentenprofil eine Umverteilung zu biologisch aktiven Komponenten vorliegt, die die Pathogenese der Ulkuskrankheit erklären kann.

3. Da Vagotomie zu einem Anstieg des Serumgastrin führt, soll untersucht werden, welchen Einfluß die Vagotomie auf die Serumgastrinkomponenten hat, ob möglicherweise extragastrisches Gastrin freigesetzt wird. Werden Komponenten mit niedrigerer biologischer Aktivität sezerniert, da eine zur Gastrinkonzentration inverse Reduktion der Säuresekretion bekannt ist ?

4. Die antrale G-Zellhyperplasie wurde als eigene ulzerogene Entität abgegrenzt und ist bei Hypergastrinämie eine wichtige Differentialdiagnose zum Zollinger-Ellison-Syndrom. Kann eine Unterscheidung dieser beiden Krankheitsbilder durch das Komponentenmuster erfolgen ?

5. Die Niere wird als möglicher Abbauort von Gastrin angesehen. Findet man dafür einen Hinweis im Komponentenmuster bei niereninsuffizienten Patienten mit Hypergastrinämie ?

6. Sind im Serum und in intestinaler Mukosa bei der Ratte Gastrinkomponenten nachweisbar ? Bestehen bezüglich der Molekülgröße der Gastrinkomponenten und Verteilungsmuster Vergleichsmöglichkeiten zum Menschen ? Wie werden die Gastrinkomponenten bei der Ratte durch Stress und durch Vagotomie verändert ?

C. METHODIK

1. Gelchromatographie:

Als einfachstes und billigstes Verfahren zur Auftrennung der Hormonkomponenten bot sich die Säulengelchromatographie an. Diese Methode wird auch in den meisten bisherigen Veröffentlichungen zur Heterogenität von Gastrin beschrieben (82, 83, 91, 126). Bei der Gelchromatographie werden die zu untersuchenden Stoffe nach Gewicht- und Formunterschieden des Moleküles getrennt. Das geläufigste Chromatographiegel ist das Sephadex-Gel. (Firma Pharmacia Fine Chemicals Uppsala/ Schweden). Es besteht aus polymerisierten Dextranen. In der vorliegenden Arbeit wurde auch "Bio-Gel" (Firma Bio-Rad Laboratories GmbH München) verwendet. Dieses wird durch Polymerisation von Polyacrylamid hergestellt (15, 26, 128, 129). Die beschriebenen Polymeren bilden bei beiden Gelen Kugeln mit zahlreichen Hydroxylgruppen, die der Substanz eine starke hydrophile Eigenschaft verleihen. Sie quellen deshalb in Wasser und Elektrolytlösungen, wobei die Polymeren Poren bilden. Das Quellungsverhalten und der Vernetzungsgrad verleihen dem Gel seine spezifischen Eigenschaften. Gele mit einem hohen Quellungsgrad, d. h. mit einem kleinen Matrixanteil, eignen sich zur Trennung größerer Moleküle, dagegen trennen die dichteren Gele mit großem Matrixanteil und kleiner flüssiger Phase Moleküle mit geringem Molekulargewicht.
Die Gelfiltration kann schematisch folgendermaßen beschrieben werden: Moleküle, die größer sind als die Poren im Gel und oberhalb der sogenannten Ausschlußgrenze des Gels liegen, wandern in der flüssigen Phase am schnellsten und erscheinen als erste in den gesammelten Fraktionen im sogenannten Ausschlußvolumen (V_0). Kleine Moleküle dagegen werden von den Poren aufgefangen und müssen im "Zickzack" nach unten wandern. Sie werden verzögert in der Reihenfolge abnehmenden

Molekülgewichtes eluiert. Die schematische Darstellung dieses "Molekül-Sieb-Effektes" gilt für beide Gele, auch unterscheiden sich die beiden oben genannten Gele nicht in der Verarbeitung und der Herstellung der Chromatographiesäule. Jedoch scheint "Bio-Gel" einige Vorteile zu bieten: Der Trennbereich von Bio-Gel P-10 300 mesh entspricht genau dem Molekülargewichtsbereich der Gastrinkomponenten. Außerdem wird Bio-Gel nicht durch Mikroorganismen befallen und zeigt bei wiederholten Chromatographien keine Volumenänderung. Deshalb wird in der vorliegenden Arbeit nach den Vorversuchen, die mit Sephadex-Gel G-50 superfine durchgeführt wurden, ausschließlich "Bio-Gel" verwendet. Damit war es möglich, an einer identischen Säulenfüllung bis zu zehn Elutionen vorzunehmen (128, 129).

a) Säulenherstellung:

Es werden normale Glasrohre verwendet (Durchmesser 10 mm, Länge 2 m, bzw. Durchmesser 16 mm, Länge 1,20 m). Ein Ende der Glasröhre wurde über der Gasflamme zu einem kapillarartigen Auslaß ausgezogen. Nach sorgfältiger Reinigung des Glasrohres wird es mit Aqua dest. gespült und mit Azeton entfettet. Das Rohr wird genau senkrecht in ein Stativ eingespannt. Die untere kapillarartige Öffnung wird mit Glaswolle ausgestopft und darüber eine 1 cm dicke Schicht Glasperlen gefüllt, um ein Herauslaufen des Gels zu verhindern. Über die Kapillaröffnung wird ein Kunststoffschlauch gesteckt, der mit einer Zwinge abgeklemmt werden kann.
Das Trockengel - ca. 15 g für eine Füllung - wird in ca. 200 ml Elutionspuffer eingerührt. Als Elutionspuffer wurde 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 gewählt, dem 0,6 mM Merthiolate (Firma Roth) als Bakteriostatikum zugesetzt wurde. Die Quellzeit beträgt ca. 24 Stunden. Dabei soll das doppelte Volumen an Puffer als Überstand vorhanden sein. Am nächsten Tag wird der Überstand abgegossen und das Gel aufgerührt. Das Gefäß wird an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen und durch den Unterdruck wird das Gel

entlüftet. Das Glasrohr wird mit Elutionspuffer vorgespült, der Auslaß geschlossen. In der Säule soll ein Drittel der Höhe an Puffer stehen. Luftblasen werden durch Klopfen an das Glasrohr entfernt. Durch einen Glastrichter wird nun vorsichtig das Gel in das Glasrohr gekippt. Es soll langsam an der Wand herunterfließen, damit keine Luftblasen eingeschlossen werden, die die Trenneigenschaften der Füllung beeinträchtigen können. Das Gel sinkt im Puffer langsam ab und bildet eine dicht gepackte Zone über den Glaskugeln. Der Auslaß wird geöffnet, um eine gleichmäßige Sedimentation des Geles zu ermöglichen. Man erkennt jetzt in der Glasröhre drei Zonen: Unten die wachsende sedimentierte Gelpackung, darüber eine weniger dichte Gelsuspension und einen klaren Überstand des Elutionspuffers. Ist die Säulenfüllung abgesunken, wird vor dem Nachfüllen der Überstand abgehoben und die Gelsuspension mit einem Glasstab aufgerührt. Bis zur gewünschten Gelbetthöhe muß zwei- bis dreimal nachgefüllt werden. Der Abfluß bleibt anschließend für 24 Stunden geöffnet, damit sich die Füllung stabilisieren kann.

Da mit einem proteinfreien Medium gearbeitet wird, ist es noch notwendig, die Säule mit Albumin zu "coaten", d. h. unspezifische Bindungsstellen im Gel abzusättigen. Dazu wird 4 ml 20 %ige Rinderalbuminlösung (Serum-Albumin Rind, trocken, reinst, Behring-Werke AG, Bestell-Nummer ORHD) eluiert. Während der Chromatographie muß dauernd ein Überstand an Puffer über dem Gelbett vorhanden sein, damit keine Luft in das Gelbett eindringt. Das Gel würde dann Risse zeigen und die Säulenfüllung wird unbrauchbar. Wir schließen deshalb das obere Ende der Glassäule luftdicht mit einem Gummistopfen und lassen durch eine Kanüle und einem Schlauch aus einem Vorratsgefäß Puffer nachtropfen. Der Schlauch am Auslaß der Säule wird über eine Persistaltik-Pumpe (Vario-Perpex 12 000, Firma LKB Instrument GmbH, Gräfelfing) geführt. Die Elutionsgeschwindigkeit kann somit konstant gehalten werden. Der Auslaßschlauch wird weiter zum Fraktionssammler geführt (Linear II, Firma Serva, Heidelberg). Das Fraktionsvolumen des Eluates

wird durch Tropfenzählung konstant gehalten.

Das gewünschte Fraktionsvolumen von 1,5 ml entspricht 19 Tropfen. Die Peristaltikpumpe erhält den Strom über den Fraktionssammler. Dieser unterbricht den Kontakt während des Fraktionswechsels und am Ende der Chromatographie.

b) Auswertung:

Bei der Gelfiltration ist eine Substanz oder ein Molekül durch sein Elutionsvolumen (V_e) charakterisiert. V_e ist das Volumen, das vom Beginn der Filtration bis zum Erscheinen des gelösten Stoffes in den Fraktionen gesammelt wird. Dieser Wert ist aber von den geometrischen Maßen der Säule direkt abhängig und kann deshalb mit einer anderen Säule nicht reproduziert werden. Um die chromatographischen Eigenschaften zu bestimmen, bildet man den Quotienten aus dem Elutionsvolumen und dem sogenannten Ausschlußvolumen V_o. V_o entspricht dem Volumen der flüssigen Phase des Gelbettes. $V_e - V_o$ wird als relatives Elutionsvolumen bezeichnet und ist von der Packungsdichte des Gels abhängig (15).
Ein vollständig unabhängiger Parameter ist der sogenannte K_{AV}-Wert. Er stellt den Verteilungskoeffizienten zwischen der flüssigen und der Gelphase dar. Er wird mit folgender Formel berechnet:

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_t ist dabei das gesamte Volumen des Gelbettes, das Volumen des Matrixanteiles wird durch $V_t - V_o$ ausgedrückt (26).

c) Trennleistung:

Da der Bereich, in dem die Moleküle getrennt eluiert werden, begrenzt ist ($V_t - V_o$), können Moleküle mit geringem Gewichtsunterschied nur schwer differenziert werden.

Vergrößert man aber das Säulenvolumen, so werden die Substanzen bei der Elution stark verdünnt, so daß die niedrigen Konzentrationen in dengesammelten Fraktionen nicht eindeutig nachgewiesen werden können. Bei überlangen Gelkolonnen wird die Trennleistung durch die Verbreiterung des Elutionsgipfels vermindert (26). Ein Maß für die Leistungsfähigkeit einer Gelkolonne bietet die Berechnung der "theoretischen Bodenhöhe" (equivalent heighth of one theoretical plate = EHTP). Man eluiert eine molekulareinheitliche Substanz an einer Gelkolonne und erhält dabei ein Elutionsdiagramm in Form einer Gauß`schen Verteilung. Man bestimmt V_e und die Weite des Gipfels (W) durch Anlagen der Tangenten. Die Zahl der Böden berechnet sich aus der Formel:

$$N = \frac{(4 \times V_e)^2}{W}$$

Die Länge der Gelpackung dividiert durch die Anzahl der Böden ergibt die einem Boden entsprechende "EHTP". Je schäler die Basis der Elutionskurve ist, desto kleiner wird die EHTP , d. h. um so besser trennt die Gelpackung.
Beeinflußt wird die EHTP durch eine unvollständige Einstellung des Diffusionsgleichgewichtes bei zu hoher Elutionsgeschwindigkeit. Bei kleinen Molekülen kann durch eine zu langsame Elution eine Longitudinaldiffusion stattfinden. Als optimale Elutionsgeschwindigkeit wird für Bio-Gel P 10 6 ml/h angegeben (129).
Auch jeder Fehler in der technischen Anordnung verschlechtert die Trennleistung, z. B. eine ungleichmäßige Packung des Gelbettes oder ein zu großer Totraum, in dem eine Vermischung stattfindet (26).
Das Probevolumen soll 1 - 2 % des Gelvolumens nicht übersteigen, da es sonst durch die breite Startzone zu keiner exakten Trennung kommt (128, 129). Die Elution wird bei Raumtemperatur durchgeführt, da Gastrin temperaturstabil zu

sein scheint (91).

d) Eichung der Chromatographiesäule:

Das Ausschlußvolumen V_o wird durch die Elution von hochmolekularem Dextran Blue (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala/Schweden Lot-Nr. 8278) bestimmt (128). V_t kann sowohl aus der Geometrie der Glassäule errechnet werden als auch durch die Elution einer niedermolekularen Substanz experimentell festgelegt werden. Da auch synthetische Präparationen von Gastrin-34, Gastrin-17 und Gastrin14 (Firma Fluca, Buchs/Schweiz) zur Verfügung standen, konnte deren Elutionsort, bzw. K_{AV}-Wert vor der Elution der Seren festgelegt werden.

e) Darstellung der Ergebnisse:

Die Gastrinkonzentrationen in den Fraktionen werden direkt mit dem Radioimmunoassay gemessen. Dieser Wert wird in die graphische Darstellung an der Ordinate aufgetragen. Auf der Abszisse wird das Elutionsvolumen, bzw. der K_{AV}-Wert aufgetragen.

2. Radioimmunoassay

Das Prinzip eines Radioimmunoassay besteht in einer kompetitiven Reaktion: das zu bestimmende Hormon und radioaktives Hormon, das den Proben in konstanter Menge zugegeben wird, konkurrieren um einen spezifischen Antikörper (100, 123). Mit steigender Konzentration des zu bestimmenden Hormons kann weniger radioaktives Hormon (Tracer) vom Antikörper gebunden werden. Nach Abtrennung des Hormon-Antikörper-Komplexes wird die radioaktive Zählrate gemessen und anhand einer Standardkurve mit definierten Hormonkonzentrationen die Hormonmenge der Probe bestimmt.

a) Herstellung des Tracers

Die radioaktive Markierung von synthetischem Humangastrin I der Firma ICI, Macclesfield/England, erfolgt im Labor nach der sogenannten Chloramin T-Methode nach Hunter und Greenwood (54, 58, 69). Nach einem modifizierten Schema läßt man synthetisches Humangastrin I mit ^{125}J-Na unter Chloramin T reagieren. Die Reaktion wird durch Zugabe von Natriumbisulfit abgebrochen. Das markierte Hormon wird durch zweimalige Gelchromatographie abgetrennt und gereinigt, anschließend auf eine Gebrauchskonzentration verdünnt (58).

b) Standardverdünnungsreihe:

Als Standardpräparation wird ebenfalls das synthetische Humangastrin I der Firma ICI verwendet. Eine Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 500 pg/ml wird fortlaufend 1 : 2 verdünnt und liefert die neun Punkte der Eichkurve. Zur Verdünnung wird der entsprechende Elutionspuffer verwendet, im vorliegenden Fall 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4, damit die Bestimmung der Hormonkonzentration in der Eichkurve

und in den gesammelten Fraktionen im identischen Milieu stattfindet.
Die Eichkurve besteht aus sechs Bestimmungen des Standardleerwertes (B_o), aus neun Doppelbestimmungen der Standardverdünnungsreihe und vier Bestimmungen der unspezifischen Bindung (N). In den N-Werten befindet sich kein Gastrinantiserum, in den B_o-Werten kein Gastrinstandard.

c) Spezifisches Antiserum:

Das spezifische Antiserum wurde durch die Immunisierung von Kaninchen mit konjugiertem synthetischen Humangastrin gewonnen. Es stehen zwei Chargen zur Verfügung, die uns freundlicherweise von Prof. Rehfeld zur Verfügung gestellt wurden. Es handelt sich um die Antiseren 2604 und 4562 (90). Bei der Durchführung des Radioimmunoassay wird den Proben zuerst das spezifische Antiserum zupipettiert. Die Vorinkubation bei 4 Grad Celsius mit dem "kalten" Hormon dauert 24, bzw. 72 Stunden. Anschließend wird der Tracer zupipettiert. Nach weiteren 24 Stunden hat sich bei dieser kompetitiven Reaktion das Gleichgewicht eingestellt (s. Tab. 1)

d) 2. Antikörper:

Die Trennung des antikörpergebundenen vom freien Hormon erfolgt durch Zugabe eines zweiten präzipitierenden Antikörpers, einem Antikaninchen-Gamma-Globulin vom Esel (Firma Wellcome, Res. Lab., Beckenham). Zu dieser Reaktion ist eine bestimmte Konzentration von Kaninchen-Gamma-Globulin (Firma Serva, Heidelberg) als Kopräzipitat notwendig (33). Die Proben werden nach einer bestimmten Inkubationszeit zentrifugiert, der Überstand anschließend abgesaugt.

e) Auswertung:

Die Impulsrate der Probe wird im Gammazählgerät (Nuclear Enterprise NE 1600) bestimmt. An das Zählgerät ist ein Lochstreifen-Plotter (Data-Dynamics 390) angebracht, der die Impulsrate, Probenummer und Zählzeit auf einen Lochstreifen überträgt. Für die Darstellung der bekannten Eichkurve wird der Quotient B/B_o x 100 als Funktion der bekannten Hormonkonzentration aufgetragen. Der Anfang der Eichkurve ist der Standardleerwert und entspricht 100 %. Mit steigender Hormonkonzentration verringert sich dieser Quotient. Teilt man die Abszisse nach dem dekadischen Logarithmus ein, so erhält man eine sigmoidale Kurvenform mit einer Geraden in der Mitte. Marschner et al. (78) führten zur Berechnung eines stetigen, optimal geglätteten Kurvenzuges ein Verfahren auf der mathematischen Basis der "spline-approximation" ein. Die hierzu notwendigen Rechenoperationen werden von einer 48 kb EDV-Anlage Typ Siemens 404/3 mit Wechselplattenspeicher, Lochstreifenperipherie und Plotter ausgeführt. Die Anlage zeichnet die optimierte Standardkurve und druckt die berechneten Hormonkonzentrationen in kürzester Zeit aus.

f) Modifizierung des Radioimmunoassay:

Um die Sensitivität des Radioimmunoassay zu verbessern, wurde eine größere Antigenmenge eingesetzt (1). Das Probevolumen wurde vergrößert bei entsprechend verkleinertem Elutionsvolumen. Außerdem wurde die Konzentration des Antikörpers verringert. Die gebräuliche Verdünnung des ersten Antikörpers von 1 : 120 000 wurde auf 1 : 180 000 erhöht (1, 30). (siehe Tab. 2).

Tabl. 1 Pipettierschema des Standardassay (Angaben in Klammern nach Tab. 2)

Standardleerwert:	0,2 ml	Elutionspuffer
	0,5 ml	Dilutionspuffer (1)
	0,1 ml	Antiserum 4562 (2)
	0,001 ml	Gammaglobulin
Standardsverdünnungs-reihe, bzw. Eluat:	0,2 ml	Standardverdünnung, bzw. Eluat
	0,5 ml	Dilutionspuffer
	0,1 ml	Antiserum 4562
	0,001 ml	Gammaglobulin
N-Wert (unspezifische Bindung)	0,2 ml	Elutionspuffer
	0,6 ml	Dilutionspuffer
	0,001 ml	Gammaglobulin

24 h Vorinkubation

Sämtliche Proben: 0,1 ml J^{125}-Gastrin (3)

24 h Erstinkubation

Sämtliche Proben 0,2 ml 2. Antikörper (4)

16 h Zweitinkubation

Tab. 2: Pipettierschema des modifizierten Assay

Standardleerwert:	0,5 ml	Elutionspuffer
	0,2 ml	Dilutionspuffer (1)
	0,1 ml	Antiserum 4562 oder 2604(2)
	0,001 ml	Gammaglobulin
Standardverdünnungs-reihe, bzw. Eluat	0,5 ml	Standardverdünnung, bzw. Eluat
	0,2 ml	Dilutionspuffer
	0,1 ml	Antiserum
	0,001 ml	Gammaglobulin
N-Wert (unspezifische Bindung)	0,5 ml	Elutionspuffer
	0,3 ml	Dilutionspuffer
	0,001 ml	Gammaglobulin
72 h Vorinkubation		
Sämtliche Proben		0,1 ml J^{125}-Gastrin (3)
24 h Erstinkubation		
Sämtliche Proben		0,2 ml 2. Antikörper (4)
16 h Zweitinkubation		

(1) 0,02 M Na-Veronalpuffer, 0,2 g/100 ml Humanalbumin (Fa. Behringwerke, Best.-Nr. ORHD), 0,02 g/100 ml Na-acid (Reagenzien Merck, Nr. 6688), eingestellt auf pH 7,4.

2) mit Dilutionspuffer 1 : 120 000 verdünnt.

3) verdünnt auf ca. 15 000 counts/2 min x 0,1 ml.

4) 1 : 40 verdünnt mit Dilutionspuffer

g) Gamma-Globulin-Titer

Zur optimalen Präzipitation des zweiten Antikörpers ist ein bestimmter Titer an Kaninchen-Gamma-Globulin notwendig. Das Gamma-Globulin liegt gelöst in einer Konzentration von 7 ug/ul vor. 60 ul werden gelöst in 4 ml-Puffer, so erhält man die Konzentration von 21 mg/0,2 ml und damit auch pro Probe. Von dieser Stammkonzentration wird eine Verdünnungsreihe mit folgenden Werten hergestellt: 21/14/10,5/7/5,25/3,5 ug/0,2 ml. Von diesen Konzentrationen werden B_o und N-Werte dreifach pipettiert.

Tabelle 3: Pipettierschema:

B_o-Werte:	0,5 ml B_o-Puffer
	0,2 mlg A_1-Puffer , der Verdünnungsreihe
	0,1 ml Gastrin-Antiserum (1 : 180 000 verdünnt
	0,1 mgl Tracer
N-Werte:	0,5 ml B_o-Puffer
	0,2 ml A_1-Puffer der Verdünnungsreihe
	0,1 ml Veronalpuffer
	0,1 ml Tracer

Nach 24 Stunden Inkubation wird der zweite Antikörper in der empfohlenen Verdünnung von 1 : 40 zugegeben. Nach weiteren 16 Stunden Inkubation wird das Präzipitat durch Zentrifugation abgetrennt, der Überstand abgesaugt und die Impulsrate des antikörpergebundenen Hormons bestimmt. Zur graphischen Darstellung tragen wir auf der Ordinate die Zählrate in Prozent der Gesamtaktivität (B/T) als sogenannte Bindung auf, die Gamma-Globulin-Konzentration wird auf der Abszisse eingezeichnet.

h) Einfluß von Natriumchlorid und Serum-Albumin auf die Antigen/Antikörper-Bindung:

Es werden Standardleerwerte in verschiedenen Konzentrationen an Humanalbumin und Natriumchlorid hergestellt. Durch

fortlaufende 2 : 1-Verdünnung erhält man für die Humanalbuminreihe die Konzentrationen 8, 4, 2, 1, 0,5 g/100 ml, für Natriumchlorid die Konzentrationen 3,6, 1,8, 0,9 und 0g/100 ml. Pipettierschema, Inkubation und graphische Darstellung erfolgen wie beschrieben.

i) Immunoidentität von Gastrin der Ratte und synthetischem Humangastrin:

Da sich die Gastrinmoleküle bei manchen Tierspezies vom menschlichen Gastrin strukturell unterschieden, mußte zuerst nachgewiesen werden, daß sich das Gewebegastrin der Ratte radioimmunologisch identisch mit der Standardpräparation verhält. Für das Serum-Gastrin der Ratte konnte bei Verwendung des Antiserum 2604 eine solche Immunoidentität bereits gezeigt werden (58).
Eine Gewebeprobe wurde fortlaufend 1 : 2 verdünnt. Die Konzentrationen wurden radioimmunologisch mit dem Antiserum 4562 bestimmt. Von einem im steilsten Bereich der Standardkurve liegenden Wert ausgehend wurden die Konzentrationen der Verdünnungsreihe berechnet und mit den tatsächlich gemessenen Konzentrationen verglichen. Außerdem wurde eine Eichkurve anhand der Verdünnungsreihe erstellt. Die gemessenen Konzentrationen wurden als Funktion des Quotienten B / B_0 aufgetragen. Der Kurvenverlauf wurde mit dem der Standardpräparation verglichen.

3. Trinktest und Blutentnahme

Zur Bestimmung des postprandialen Gastrinverhaltens nehmen die Versuchspersonen eine standardisierte Testmahlzeit ein. Die gute Reproduzierbarkeit dieser Methode wurde von Berger und Mitarbeitern bewiesen (9). Die Untersuchung wird morgens zwischen 8.00 und 9.00 Uhr durchgeführt, die Versuchspersonen haben mindestens 12 Stunden gefastet. Die Testmahlzeit besteht aus 40 g Biosorbin MCT (Firma Pfrimmer & Co, Erlangen) gelöst 125 ml Wasser. Aus einer in der Kubitalvene liegenden Kanüle wird in definierten Zeitabständen vor und nach der Testmahlzeit Blut entnommen. Bis zur Zentrifugation wird das Blut in ein Eiswasserbad gestellt. Bis zur radioimmunologischen Gastrinbestimmung wird das Serum tiefgefroren bei minus 20 Grad Celsius aufbewahrt.

4. Untersuchungsmaterial:

a) Gesunde Probanden

Als "Kontrollkollektiv" dienten 93 anamnestisch magengesunde Personen (7). Die freiwilligen Probanden unterzogen sich der standardisierten Testmahlzeit mit Blutentnahme zur Bestimmung des prae- und postprandialen Gastrinprofils. Zur chromatographischen Untersuchung wurden die Seren von 7 Patienten ausgewählt, deren Gastrinkonzentrationen innerhalb der einfachen Standardabweichung lagen. Es sollte das basale und stimulierte Serum-Gastrin zu den Zeitpunkten "- 10 Minuten" (Basalwert), "+ 20 Minuten" (postprandiale "peak"-Konzentration) und "+ 60 Minuten" nach Testmahlzeit untersucht werden. Die jeweils zusammengehörenden Seren wurden "gepoolt". Ein Aliquot (1 - 3 ml) wurde jeweils zur Chromatographie auf die Säule gegeben.

b) Patientenkollektive:

Patienten mit rezidivierendem Ulcus duodeni wurden vor, bzw. 10 Tage, 3 Monate und 1 Jahr nach selektiver proximaler Vagotomie ohne Pyloroplastik dem Biosorbin-Trinktest unterzogen. Zur Chromatographie wurden, wie oben beschrieben, die Seren von fünf über den Zeitraum bezüglich ihres Gastrinverhaltens identische Patienten ausgewählt. Außerdem standen hypergastrinämische Seren zweier Patienten mit immunhistologisch nachgewiesener antraler G-Zellhyperplasie zur Verfügung. Auch bei diesen Patienten wurde der Trinktest durchgeführt. Die ausgewählten Seren wurden jeweils gepoolt und eluiert. Die Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz wiesen ein Serum-Kreatinin über 7 mg/100 ml auf und waren für eine Nierentransplantation vorgesehen. Es wurden vier Patienten mit erhöhter Serumgastrinkonzentration ausgewählt. Das Komponentenprofil wurde im gepoolten Nüchternserum untersucht.

In den Vorversuchen wurden das hypergastrinämische Serum einer Patientin mit endoskopisch nachgewiesener chronisch-atrophischer Gastritis chromatographiert. Die Anazidität war durch Pentagastrin-Test objektiviert, zusätzlich lag eine perniziöse Anämie vor. Die autonome Gastrinsekretion bei den Patienten mit Zollinger-Ellison-Syndrom war durch Stimulationsteste mit der standardisierten Biosorbin-Testmahlzeit, Sekretininfusionstest und Calciuminfusionstest nachgewiesen (8, 9, 59, 63). Es wurden die Seren von zwei Patienten zur Eichung der Chromatographiesäule und zum Vergleich der beiden Antikörper-Chargen verwendet.

c) Serum- und Gewebsgastrin bei der Ratte:

Die Seren und Gewebeextrakte wurden von Frau M. Keller dankenswerterweise zur Verfügung gestellt. Als Versuchstiere dienten weibliche Wistar-Albino-Ratten. Es wurden 4 Versuchsgruppen gebildet: "Vagotomie", "Stress", "Vagotomie und Stress" und "Kontrolle". Als Stressmodell wurde eine 12stündige Immobilisation durch Anlegen einer zirkulären Gipsmanschette gewählt. Die Vagotomie erfolgte bei Inhalationsnarkose durch subdiaphragmale Durchtrennung des N. vagus. Die Blutentnahme geschah am narkosierten Tier nach Thorakotomie durch Herzpunktion. Gewebeproben von Fundus, Antrum, Duodenum und Pankreas wurden nach dem Wiegen in Aqua dest. 30 Minuten gekocht, durch Ultrazentrifugation sedimentiert. Der Gewebsextrakt im Überstand wurde wie das Serum bei minus 20 Grad Celsius tiefgefroren aufbewahrt. (57). Zur Gelchromatographie wurden wiederum jeweils 7 "repräsentative" Seren und Gewebeproben ausgewählt und gepoolt. Die Gewebeproben mußten vor der Chromatographie auf eine Konzentration verdünnt werden, die im Meßbereich des Radioimmunoassays liegt.

D. ERGEBNISSE

1. Methodik des Radioimmunoassay

a) Inkubationszeit und Antikörperkonzentration

Als erstes Ziel sollte die Sensitivität des Radioimmunoassay verbessert werden, da nach der Chromatographie vor allem niedrige Konzentrationen in den eluierten Fraktionen zu messen sind. Die Sensitivität eines Radioimmunoassay wird ausgedrückt durch die untere Nachweisgrenze, die als die kleinste, von Null verschiedene Menge, gemessen werden kann. Mathematisch definiert ist sie als die dreifache Standardabweichung des Leerwertes B_o (30, 53). Im ersten Schritt wird das Verhältnis von Antigen-Konzentration zu Antikörper-Konzentration zugunsten des Antigens verschoben. Es wird ein größeres Probevolumen eingesetzt, zugleich wird die Verdünnung des spezifischen Antiserums auf 1 : 180 000 erhöht. Abbildung 1 zeigt, daß die Standardkurve der höheren Antigen-Konzentration verglichen mit der des Routineansatzes wesentlich steiler verläuft. Der 50 %-Intercept wird von 82 pg/ml auf 33 pg/ml gesenkt. Auf einer steileren Kurve läßt sich die Hormonkonzentration exakter ablesen. Gleichzeitig wird die untere Nachweisgrenze von 7,1 pg/ml auf 3,7 pg/ml verbessert. Als zweiter Schritt wurde die Vorinkubationszeit von 24 Stunden auf 72 Stunden verlängert. Dies bringt nochmals eine Verbesserung der unteren Nachweisgrenze auf 1,9 pg/ml. Der Kurvenverlauf, wie aus Abbildung 2 zu ersehen ist, wird nur bei den niedrigen Konzentrationen etwas steiler. Der übrige Kurvenverlauf, wie auch der 50 %-Intercept, wurden nicht mehr verändert. (siehe Abb. 2 und 3).

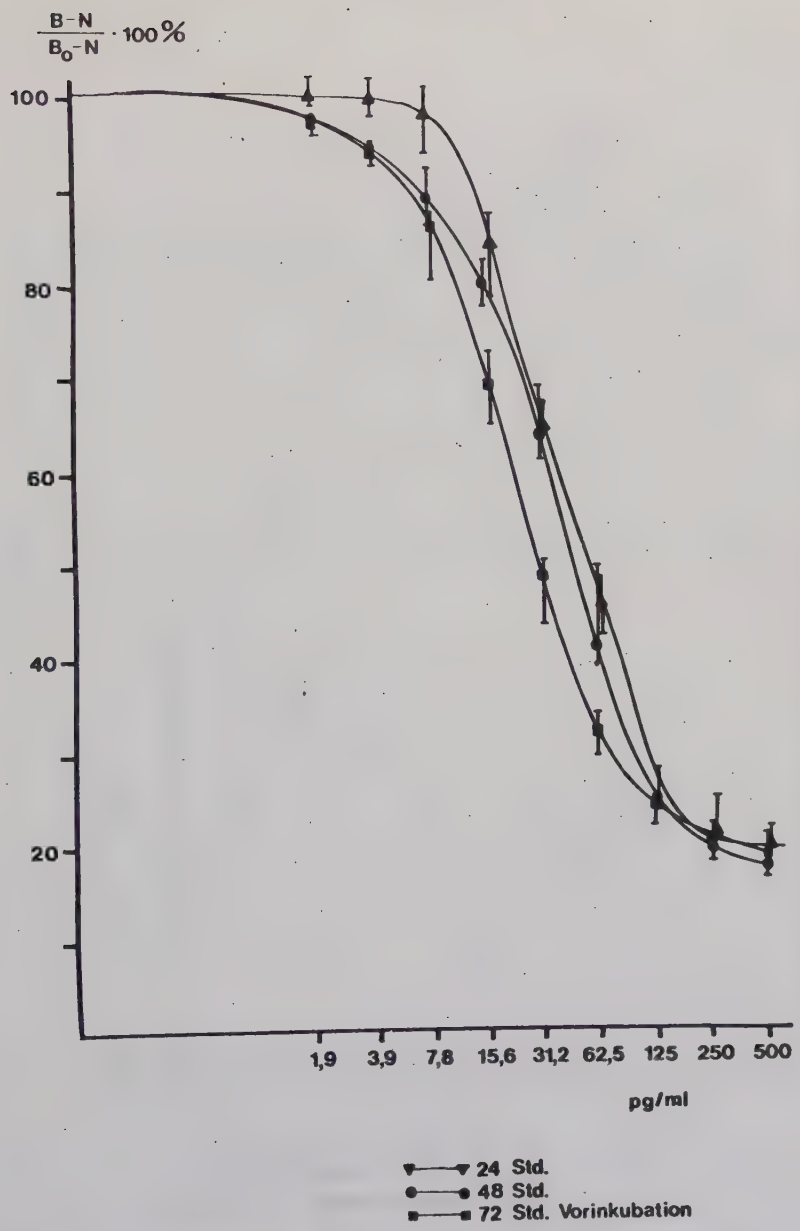

Abb. 2: Einfluß der Vorinkubationszeit auf den Verlauf der Standardverdünnungskurven mit synthetischem Humangastrin I (ICI).

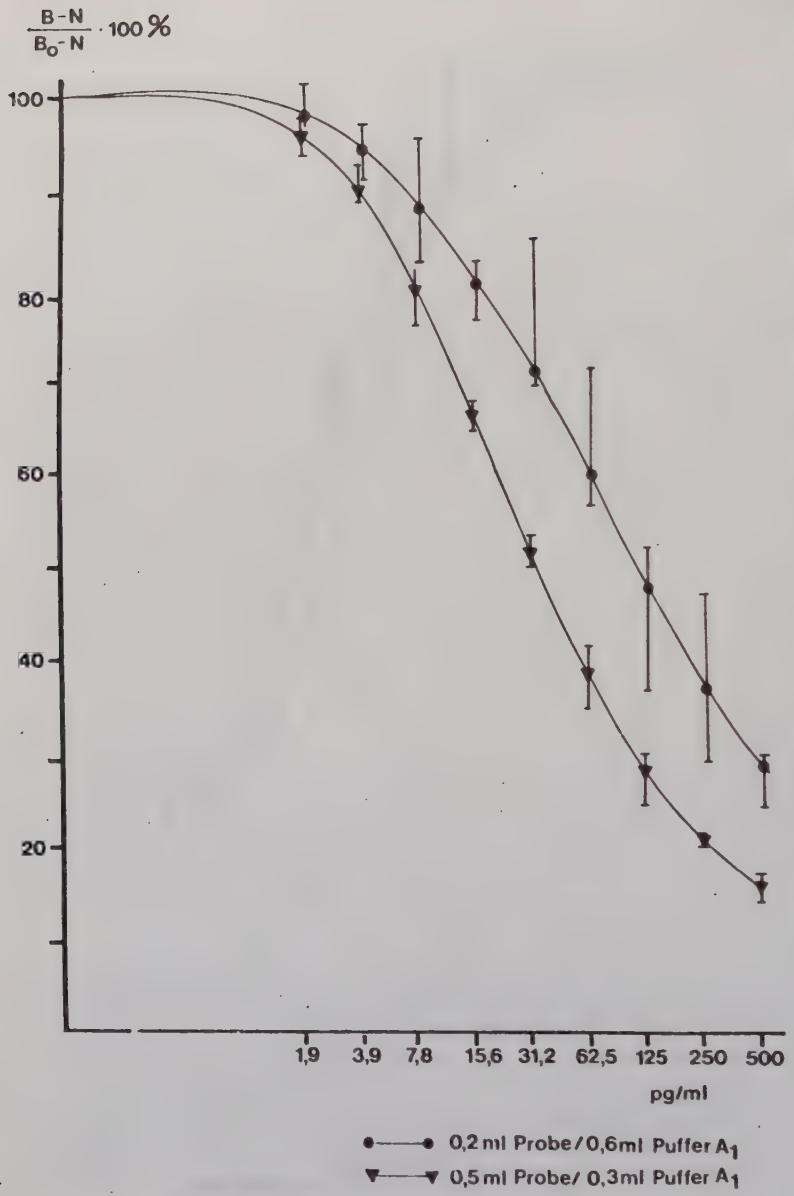

Abb. 3: Einfluß der Antigenkonzentration auf den Verlauf der Standardverdünnungskurve.

b) Optimierung des Gamma-Globulin-Titer:

Zur optimalen Praezipitation des zweiten Antikörpers ist eine bestimmte Menge an Kaninchenserum pro Probe notwendig (33). Da gegenüber den Routine-Assay die Inkubationsbedingungen und die Antikörperkonzentrationen verändert wurden, mußte die optimale Gamma-Globulin-Konzentration neu ermittelt werden. Abbildung zeigt bei niedrigen Gamma-Globulin-Konzentrationen einen steilen Anstieg. Die höchsten Bindungen werden bei einer Konzentration von 7 ug/Probe erreicht, hier bildet der Kurvenverlauf ein Plateau. Ab dem Wert 10,5 ug/Probe fallen die Bindungsraten wieder ab. Als optimale Konzentration wird daher 7 ug Gamma-Globulin/Probe gewählt (siehe Abbildung 4).

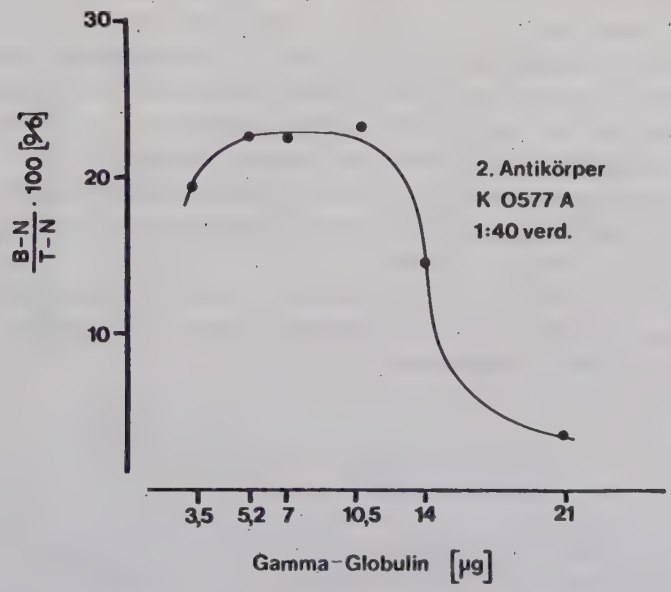

Abb. 4: Abhängigkeit der Präzipitationsreaktion des 2. Antikörpers vom Titer des als Kopräzipitat zugesetzten Kaninchen-Gammaglobulin.

c) Unspezifische Interferenz von Natriumchlorid und Albumin auf die Bindungsrate:

Es ist bekannt, daß Antikörper-Antigen-Reaktionen von vielen unspezifischen Faktoren gestört werden können, z. B. von pH-Wert, Salz- und Proteinkonzentration, Temperatur, antimikrobiellen Zusätzen, Hämoglobin etc. (1, 100). Da bei der Gelfiltration Albumine und Elektrolyte abgetrennt werden und in hoher Konzentration in V_o und V_t erscheinen, mußte eine unspezifische Interferenz dieser Stoffe ausgeschlossen werden. Dies ist um so bedeutsamer, als ein größeres Probevolumen eingesetzt werden sollte. Abbildung 5 a zeigt, daß bei Natriumchlorid mit steigender Konzentration die Bindungsrate konstant abnimmt. Die Probe ohne Natriumchlorid weist somit die höchste Bindungsrate auf.
Albumin verursacht ebenfalls eine starke Verdrängung des Antikörpers vom Antigen. Nach steilem Abfall der Bindungsraten bereits bei den niedrigen Konzentrationen läuft die Kurve ab dem Wert 1 g% flach aus (siehe Abbildung 5 b).
Nach diesem Ergebnis muß eine gemessene Immunreaktivität bei der Chromatographie in V_o und V_t als unspezifische Interferenz betrachtet werden.
Das dem Elutionspuffer als Bakteriostatikum beigesetzte Merthiolate hatte in der Konzentration von 0,6 mM keinen Einfluß auf die Bindungsrate.

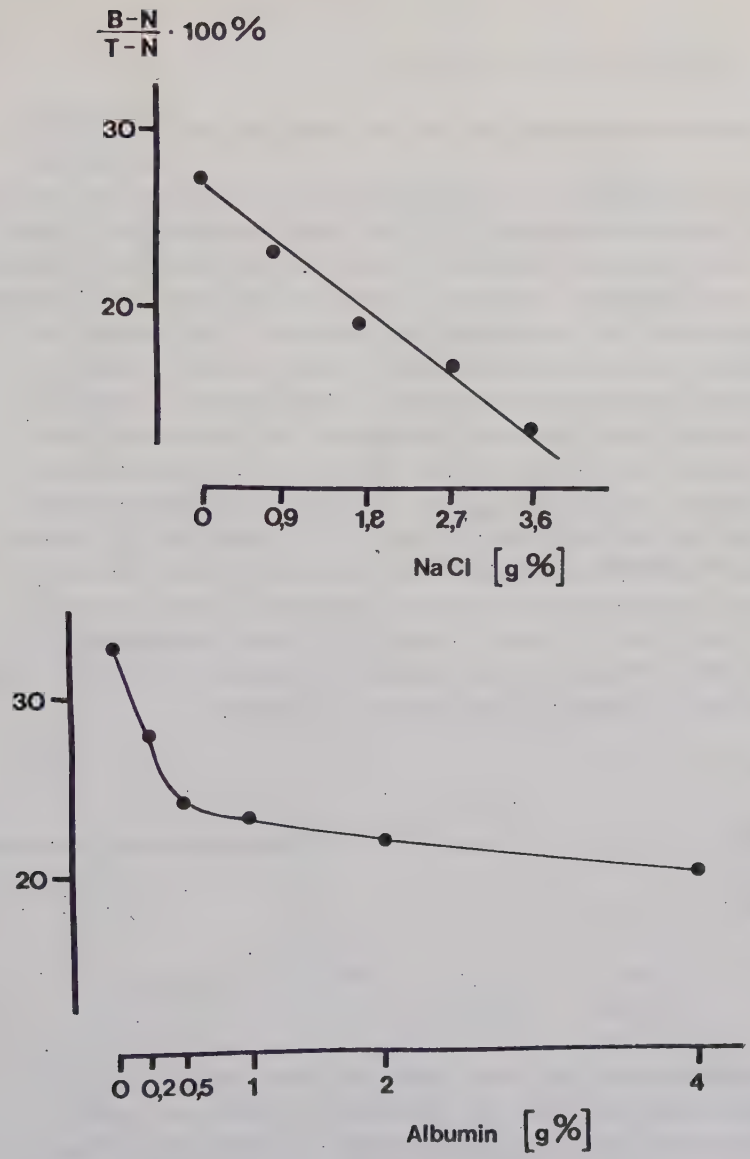

Abb. 5a,b: Unspezifische Interferenz verschiedener Konzentrationen von Natriumchlorid und Albumin auf die Antigen-Antikörperbindungsrate.

2. Heterogenität von Serumgastrin

a) Gastrinkomponenten bei atrophischer Gastritis:

Um die Trennfähigkeit unserer Säule (Sephadex G-50 Gel superfine, Säulenabmessungen 10 x 1 800 mm) zu beurteilen, wurde das Serum einer Patientin mit chronisch-atrophischer Gastritis und einer extremen Hypergastrinämie (2 ng/ml) eluiert. Abbildung 2 zeigt das erhaltene Elutionsprofil. Es lassen sich deutlich vier Peaks unterscheiden, die den vier Hauptkomponenten des Gastrin entsprechen. V_o wird durch die Elution von Dextran Blue bestimmt. Der erste Peak entspricht nach den Angaben von Rehfeld et al.(89, 91, 95) "Component I". Der zweite Peak eluiert an der Position von Gastrin-34 und enthält die meiste Immunreaktivität. Das dritte und vierte Peak entsprechen Gastrin-17 und Gastrin-14. Wegen des geringen Unterschiedes in der Molekülgröße lassen sie sich nicht mehr exakt trennen. Keiner der Peaks konnte entsprechend den sulfatierten und unsulfatierten Formen der Gastrinkomponenten doppelgipflig dargestellt werden.

Tabelle 4

Verteilung der Immunreaktivität (chronisch-atrophische Gastritis)

Comp. I	G-34	G-17	G-14	
55	465	200	30	(pg/ml)
7 %	62 %	27 %	4 %	

In einem Versuch mit einer kürzeren Chromatographiesäule (Abmessungen 16 x 1000 mm) ließ sich in demselben Serum nur der Hauptpeak des "big gastrin" eindeutig identifizieren. Daher schien uns die Verwendung der langen dünnen Säule die besseren Ergebnisse zu garantieren (Abbildung 6 b).

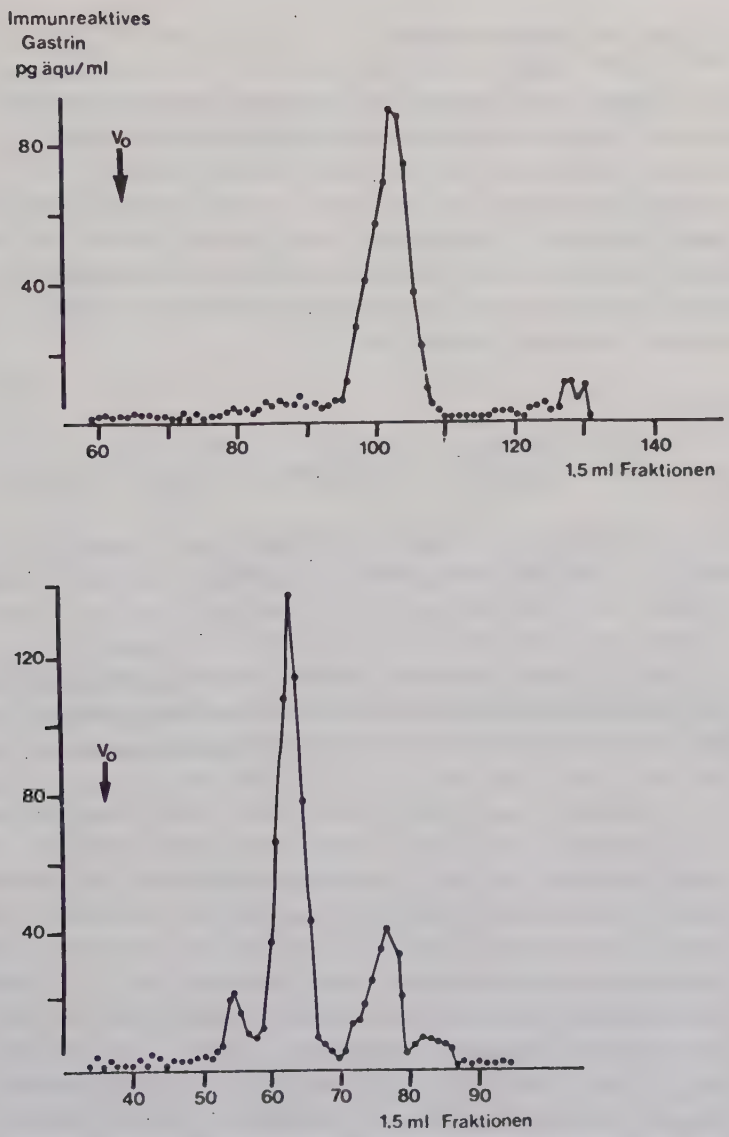

Abb. 6: Elution eines hypergastrinämischen Serums (chronisch-atrophische Gastritis) über Sephadex G-5o sf - Chromatographiesäulen mit verschiedenen Abmessungen (oben 16 x 1ooo mm, unten 1o x 18oo mm).

b) Zollinger-Ellison-Syndrom:

An einem Serum eines Patienten mit einem Gastrinom verglichen wir die zwei zur Verfügung stehenden Chargen des Gastrin-Antiserums (Antikörper 2604 und Antikörper 4562) auf ihre Bindungsfähigkeit der einzelnen Gastrinkomponenten. Ein Serum derselben Blutabnahme wurde unter identischen Bedingungen (Sephadex G 50 superfine, Säulenabmessungen 10 x 1 800 mm) eluiert und die Gastrin-Komponenten mit beiden Antikörpern bestimmt. (siehe Abb. 7).

Tabelle 5

Verteilung der Immunreaktivität (Zollinger-Ellison Syndrom)

	Comp.I	G-34	G-17	G-14	
AK. 4562	3	243,6	340,9	-	(pg/ml)
AK. 2604	7,5	332,6	362,6	-	

Nach diesen Ergebnissen bindet der Antikörper 4562, mit dem alle folgenden Bestimmungen durchgeführt werden mußten, "big gastrin" nur zu 75 %. Auch die Affinität zu Component I scheint geringer. (Vgl. 67).
Da die Verwendung eines vollsynthetischen Geles eine bessere Reproduzierbarkeit zu gewährleisten scheint, wurden die folgenden Versuche an einer Chromatographiesäule mit Bio-Gel P 10,200 - 300 mesh durchgeführt. Nach Kalibrierung der Säule mit synthetischem Gastrin-34, Gastrin-17 und Gastrin-14 wurde das hypergastrinämische Serum eines Patienten mit Zollinger-Ellison-Syndrom eluiert. Das Elutionsdiagramm (Abb. 8) zeigt zwei große Peaks. Der erste erscheint an der Position von G-34 (K_{av} 0,42), der zweite größere Peak erscheint doppelgipflig und erstreckt sich über den Bereich von G-17 und G-14 (K_{av} 0,75 und 0,85). Diese beiden Komponenten lassen sich wiederum nicht exakt trennen. Der Component I dürfte

die geringe Immunreaktivität entsprechen, die bei K_{av} 0,33 erscheint. Auch in V_o finden wir eine geringe Immunreaktivität, die aber aufgrund der Vorversuche als unspezifische Interferenz der Serum-Albumine zu interpretieren ist.

Tabelle 6

Verteilung der Immunreaktivität (Zollinger-Ellison-Syndrom) (Abb. 8)

Comp.I	G-34	G-17	G-14	
6,22	132,73/	267,1/	35,9	(pg/ml)
1,4 %	30,0 %	60,4 %	8,1 %	

Die K_{av}-Qoutienten differieren gegenüber der Sephadex-Säule, da Bio-Gel eine niedrigere Ausschlußgrenze hat. Bei Bio-Gel wandern Moleküle mit einem Molekulargewicht über 20 000 im Ausschlußvolumen. Bei Sephadex G-50 liegt die Ausschlußgrenze nach Angabe des Herstellers bei 30 000 (128, 129). Die theoretische Bodenhöhe der Chromatographiesäulen als Maß für ihre Trennschärfe wurde an G-34 berechnet und ergab für beide Gele den Wert 0,7.

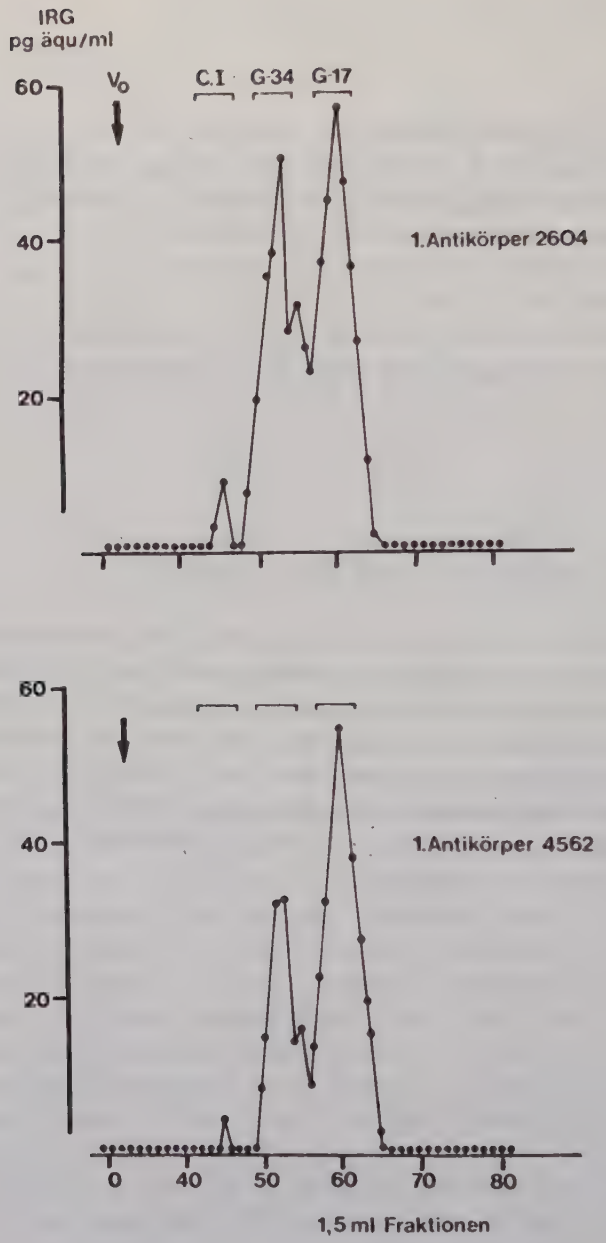

Abb. 7: Vergleich der Antiseren 2604-8 und 4562 bei der Elution eines hypergastrinämischen Serums (Zollinger-Ellison-Syndrom) über eine Sephadex G-50 - Chromatographiesäule.

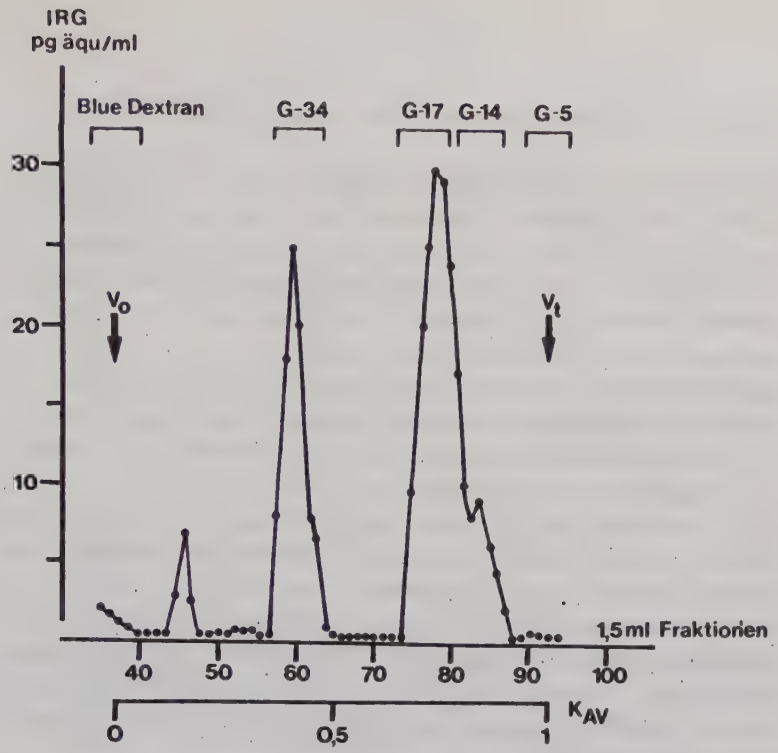

Abb. 8: Kalibrierung der Bio-Gel P1o - Chromatographiesäule mit dem Serum eines Patienten mit Zollinger-Ellison-Syndrom und mit synthetischen Humangastrinpräparationen.

c) Serumgastrinkomponenten beim Normalkollektiv:

Im Nüchternserum findet man einen deutlichen "peak", der Gastrin-34 entspricht. Außerdem läßt sich an den Positionen von Gastrin-17 und Gastrin-14 Immunreaktivität messen; sie ist aber nicht in zwei "peaks" differenzierbar. Der gemeinsame "peak" von Gastrin-17 und Gastrin-14 und der "peak" bei Gastrin-34 erscheinen gleich hoch.
Unmittelbar nach Einnahme der Testmahlzeit steigt die Serumgastrinkonzentration steil an und fällt nach einer Plateauphase wieder langsam ab. Bei 2 Stunden p. c. wird der Ausgangswert wieder erreicht (10).
Im 20 Minunten nach Testmahlzeit entnommenen Serum ist der höchste "peak" an der Position von Gastrin-17, während Gastrin-34 keine Zunahme gegenüber dem Basalwert zeigt.
In der Spätphase (60 Minuten nach Testmahlzeit) bei abfallender Gastrinkonzentration erkennt man im Komponentenmuster eine Zunahme von Gastrin-34. Die "peaks" von Gastrin-34 und Gastrin-17 haben nun wieder ungefähr gleiche Höhe (siehe Abbildung 9).

NORMALKOLLEKTIV

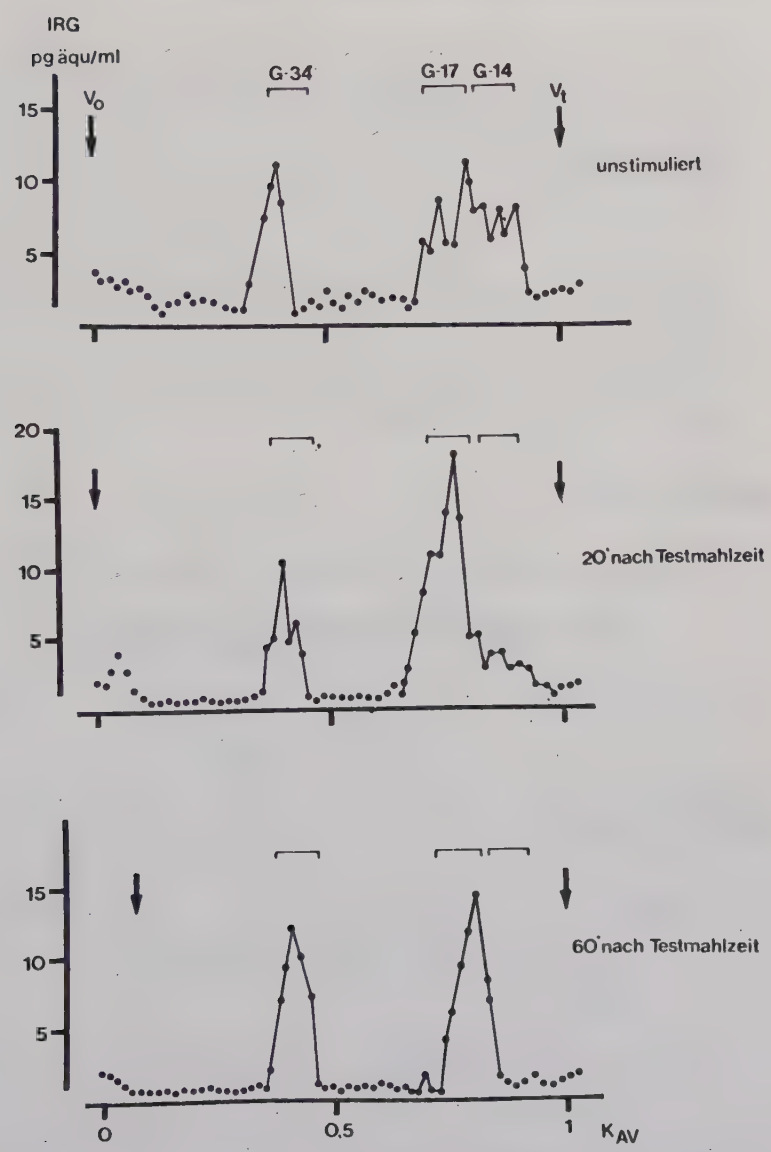

Abb. 9: Gastrinkomponenten in gepoolten Seren von fünf magengesunden Probanden vor, bzw. 2o und 6o min. nach einer standardisierten Testmahlzeit.

d) Gastrinkomponenten bei Ulcus duodeni:

Die basale Gastrinkonzentration bei Patienten mit Ulkuskrankheit ist gegenüber einem Kontrollkollektiv nicht erhöht. Jedoch zeigt sich postprandial bei Patienten mit Ulcus duodeni eine überhöhte und verlängerte Gastrinantwort (10). Im Nüchternserum besteht die Immunreaktivität aus Gastrin-34 und Gastrin-17 mit einem leichten Überwiegen von Gastrin-34. Der postprandiale Anstieg erfolgt durch Zunahme von Gastrin-34, Gastrin-17 zeigt nur einen kleinen Anstieg. Auch 60 Minuten nach Testmahlzeit ist Gastrin-34 noch vorherrschend. Die Gastrin-17-Konzentration nahezu unverändert. Gastrin-14 ist nach Stimulation nur in geringer Konzentration nachweisbar. (siehe Abbildung 10 und Tabelle 7).

Tabelle 7

Verteilung der Immunreaktivität (Ulcus duodeni)

	Comp. I	G-34	G-17	G-14	
- 10 Min.	-	28,4	20,6	-	(pg/ml)
		57,4 %	42,6 %		
+ 20 Min.	-	74,0	25,2	5,0	
		71,0 %	24,3 %	4,7 %	
+ 60 Min.	-	34,1	15,4	7,2	
		59,8 %	27,5 %	12,6 %	

Ulcus duodeni

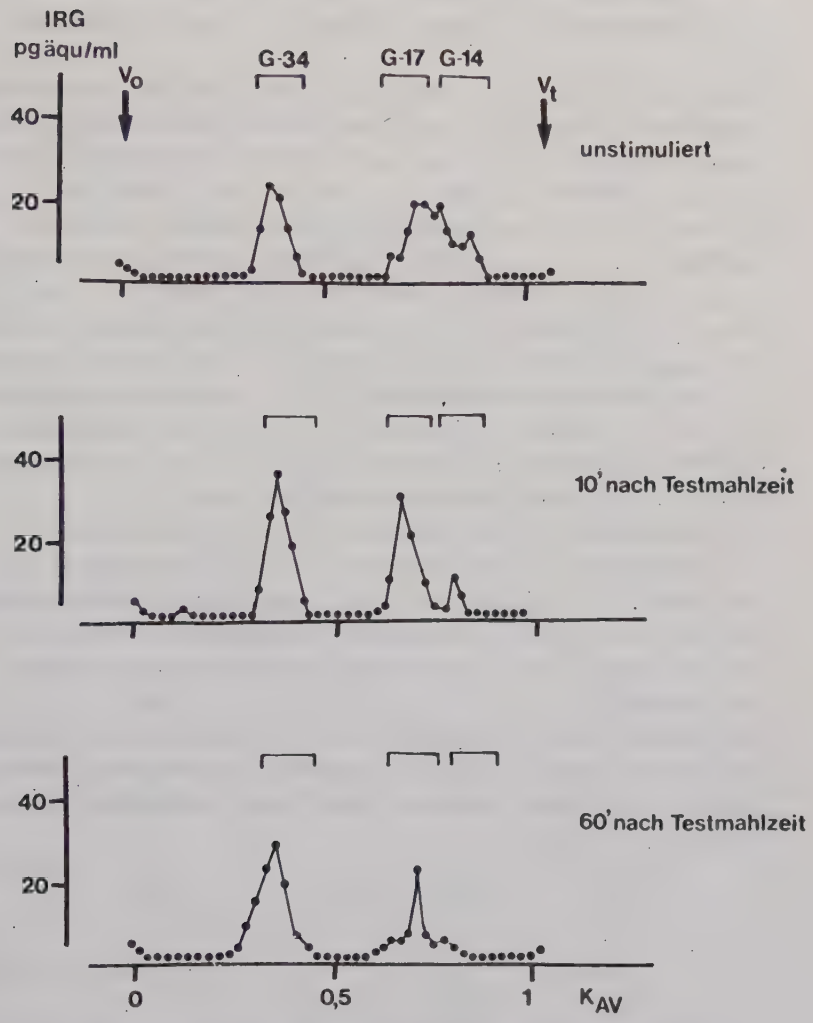

Abb. 1o: Gastrinkomponenten in gepoolten Seren von fünf Patienten mit Ulcus duodeni.

e) Zustand nach selektiv - proximaler Vagotomie ohne Pyloroplastik (10 Tage, 3 Monate, 1 Jahr postoperativ)

Gegenüber praeoperativ zeigen die Patienten nach selektiver proximaler Vagotomie signifikant höhere basale und "peak"-Konzentrationen sowie ein im Mittel deutlich erhöhtes postprandiales Gastrinprofil (10, 60, 61, 70). Dabei war 10 Tage postoperativ die postprandiale Gastrinantwort nicht so ausgeprägt wie zu den beiden späteren Untersuchungszeitpunkten. Im Nüchternserum entfällt nach Vagotomie 75 - 80 % der Gesamt-Immunreaktivität auf Gastrin-34. Am größten ist der "big gastrin" -Anteil zum Zeitpunkt 10 Tage postoperativ.
Die Konzentration von Gastrin-17 ist gegenüber praeoperativ als Absolutwert unverändert. Geringe Konzentrationen von "Component I" und Gastrin-14 sind zu den Zeitpunkten 3 Monate und 1 Jahr postoperativ nachweisbar.
Die postprandiale Gastrinantwort erfolgt durch einen gleichzeitigen Anstieg von Gastrin-34 und Gastrin-17, wobei prozentual Gastrin-17 etwas mehr zunimmt. Gastrin-34 bleibt jedoch die vorherrschente Komponente. Component I und Gastrin-14 sind in geringen Konzentrationen konstant nachweisbar.
60 Minuten nach Testmahlzeit ist das Verhältnis der Gastrinkomponenten ähnlich wie im Nüchternserum mit einem deutlichen Überwiegen von Gastrin-34 (siehe Abbildung 11, 12, 13 und Tabelle 8).

Tab. 8 Verteilung der Immunreaktivität(Selektiv-proximale Vagotomie)

10 Tage nach OP

	Comp. I	G-34	G-17	G-14	
- 10 Min	-	85,6	19,1		(pg/ml)
		81,7 %	18,3 %	-	
+ 20 Min	3,0	103,5	42,8	8,0	
	1,9 %	65,8 %	27,2 %	5,1 %	
+ 60 Min	-	34,1	15,7	7,2	
		59,8 %	27,5 %	12,7 %	

3 Monate post OP

	Comp I	G-34	G-17	G-14
- 10 Min	2,3	83,8	25,1	5,0
	1,9 %	72,2 %	21,6 %	4,3 %
+ 20 Min	2,0	112,9	82,3	10,0
	0,9 %	54,5 %	39,8 %	4,8 %
+ 60 Min	-	70,3	21,1	9,5
		69,6 %	20,9 %	9,5 %

1 Jahr post OP

	Comp I	G-34	G-17	G-14	
- 10 Min	3,0	73,3	31,0	8,0	(pg/ml)
	2,6 %	63,6 %	26,9 %	6,9 %	
+ 20 Min	3,0	102,1	75,3	7,0	
	1,6 %	54,5 %	40,1 %	3,8 %	
+ 60 Min	-	56,9	38,6	5,0	
		56,6 %	38,5 %	4,9 %	

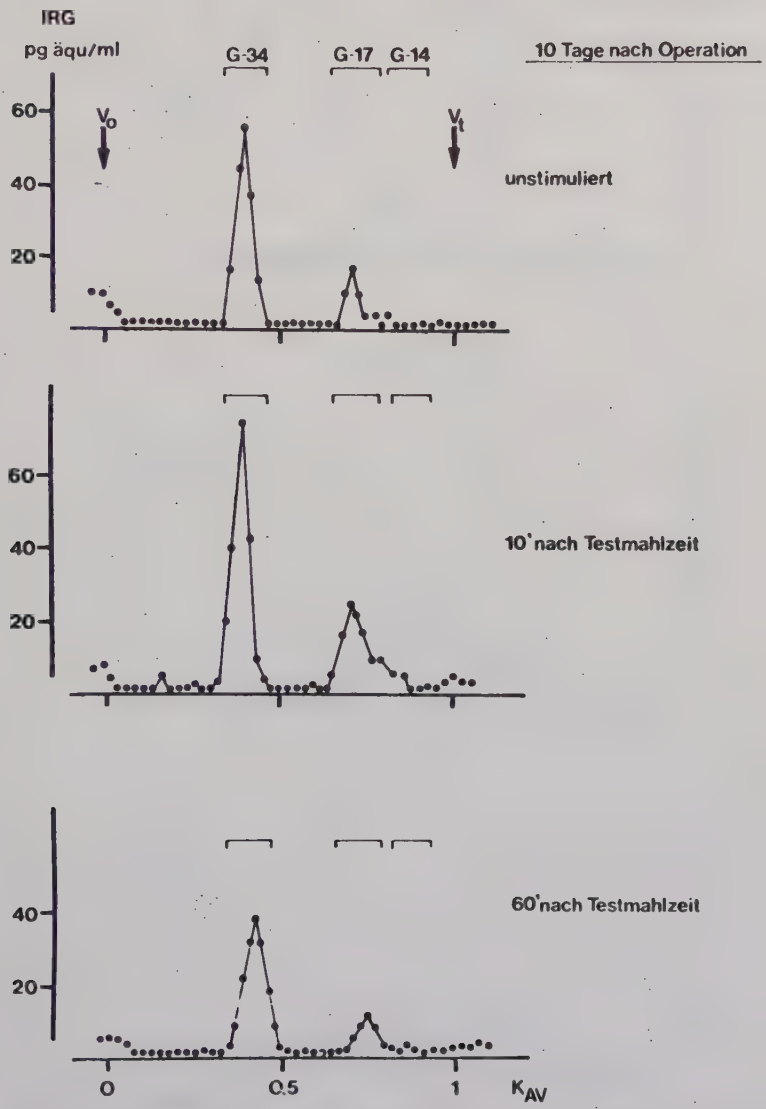

Abb. 11: Gelchromatogramme gepoolter Seren von fünf Patienten 1o Tage nach selektiv-proximaler Vagotomie.

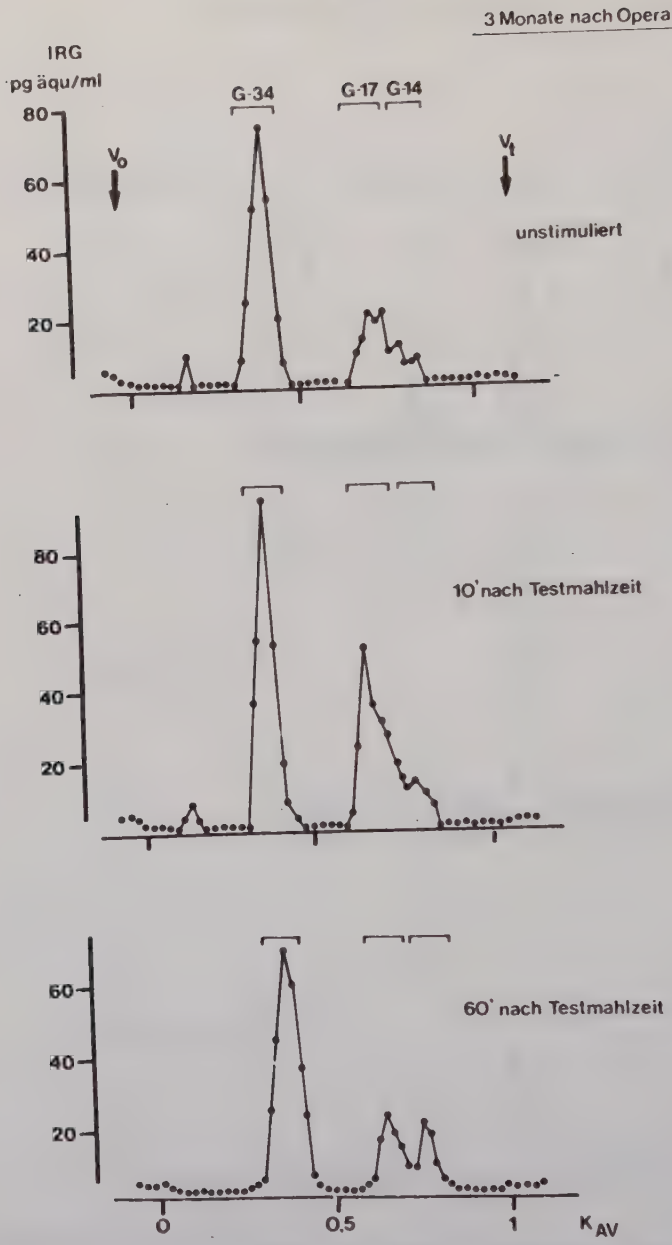

Abb. 12: Gelchromatogramme gepoolter Seren von fünf Patienten 3 Monate nach selektiv-proximaler Vagotomie.

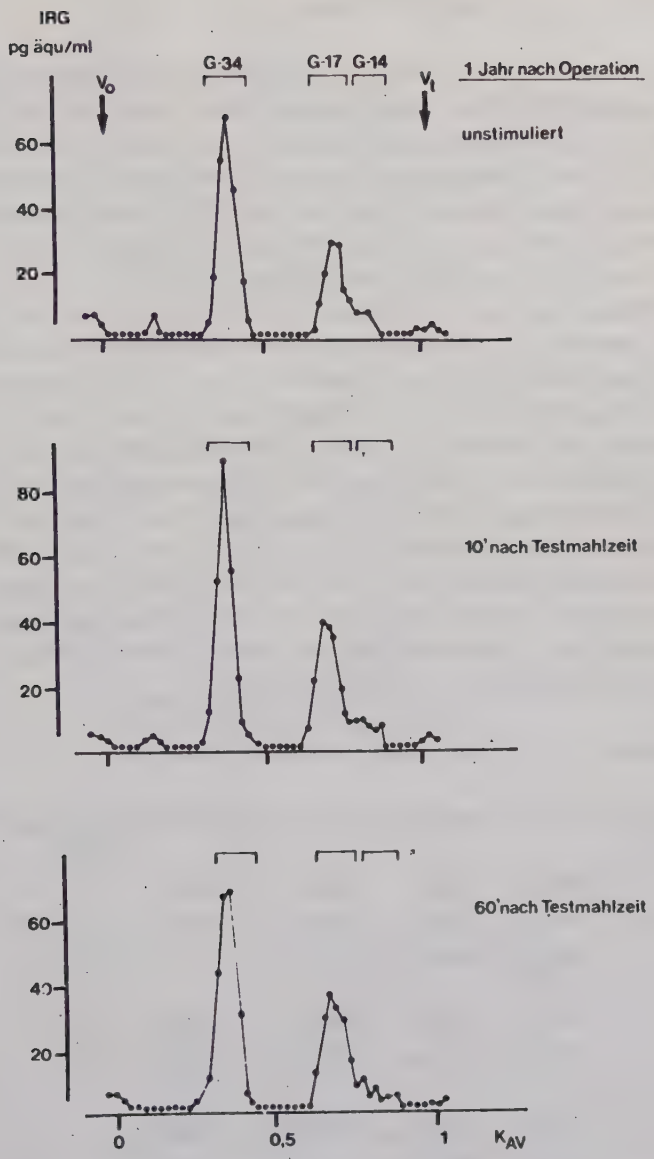

Abb. 13: Gelchromatogramme gepoolter Seren von fünf Patienten 1 Jahr nach selektiv-proximaler Vagotomie.

f) Antrale G-Zellhyperplasie:

Patienten mit antraler G-Zellhyperplasie haben im Nüchternserum erhöhte Gastrinkonzentrationen, einzelne Patienten können auch Gastrinkonzentrationen im oberen Normbereich haben (7, 58). Postprandial zeigen diese Patienten einen abnorm hohen Anstieg. Dies ist ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal sowohl zur normogastrinämischen Ulkuskrankheit als auch zum Zollinger-Ellison-Syndrom (58, 60).
Im Nüchternserum ist Gastrin-34 die vorherrschende Komponente vor Gastrin-17. Jedoch fallen auch relativ hohe Konzentrationen von Component I und Gastrin-14 auf. Die überschießende Gastrinantwort nach Testmahlzeit erfolgt durch eine starke Zunahme von Gastrin-17. Zwar nimmt auch Gastrin-34 zu, jedoch besteht die postprandiale Immunreaktivität zu mehr als der Hälfte aus Gastrin-17. Component I und Gastrin-14 sind in den beiden eluierten Seren nicht stimulierbar. Eine Stunde nach Testmahlzeit ist das Verhältnis von Gastrin-34 und Gastrin-17 fast nicht verändert . Gastrin-17 ist nach Absolut- und Prozentwerten die dominierende Komponente (siehe Abbildung 14 und Tabelle 9).

Tabelle 7

Verteilung der Immunreaktivität (Antrale G-Zellhyperplasie)

	Comp.I	G-34	G-17	G-14	
- 10 `	44,8	139,6	94,5	36,7	(pg/ml)
	14,1 %	44,2 %	29,9 %	11,6 %	
+ 10 `	58	185,8	286,7	31,6	
	10,3 %	33 %	51 %	5,6 %	
+ 60 `	38,8	167,4	203,1	11,2	
	9,2 %	39,8 %	48,2 %	2,6 %	

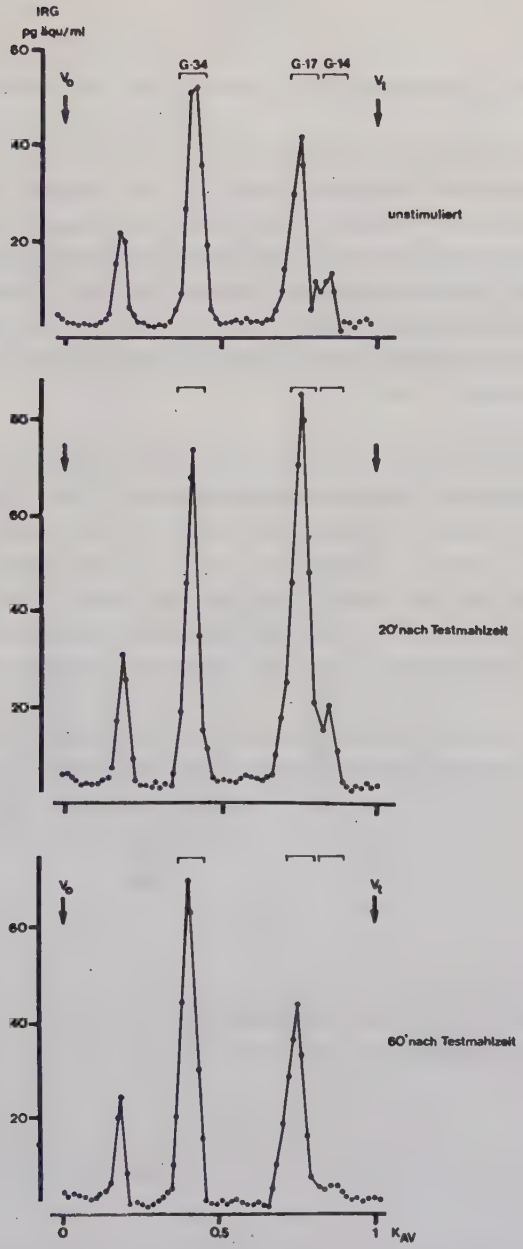

Abb. 14: Gelchromatographisch aufgetrennte Gastrinkomponenten in den Poolseren von zwei Patienten mit antraler G-Zellhyperplasie, vor, 2o min. und 6o min. nach Testmahlzeit.

g) Gastrin-Komponenten bei chronischer Niereninsuffizienz:

Der Median der Serum-Gastrin-Konzentrationen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ist erhöht, wobei jedoch die zentrale 90 %-Masse eine weite Streuung aufweist. Zwischen Serum-Kreatinin und Serum-Gastrin-Konzentration besteht keine Korrelation. Die Patienten sind meist norm- oder sogar hypazide. Es besteht keine direkte oder indirekte Korrelation zwischen Magensäuresekretion und Serum-Gastrin-Konzentration . (10)

Das Chromatogramm zeigt, daß fast die Hälfte der eluierten Immunreaktivität Gastrin-34 entspricht. Ein davor eluierter Peak entspricht wohl der Component I. Dieser ist unverhältnismäßig groß und enthält ca. 13 % der gesamten Immunreaktivität. Die an den Positionen von Gastrin-17 und Gastrin-14 eluierte Immunreaktivität erscheint in mehreren Peaks . Sie läßt sich nicht eindeutig den beiden Komponenten zuorden.

Weiter fällt bei diesem Versuch die niedrige Wiederfindung nach der Chromatographie auf. Sie liegt bei 50 % (Abb. 15).

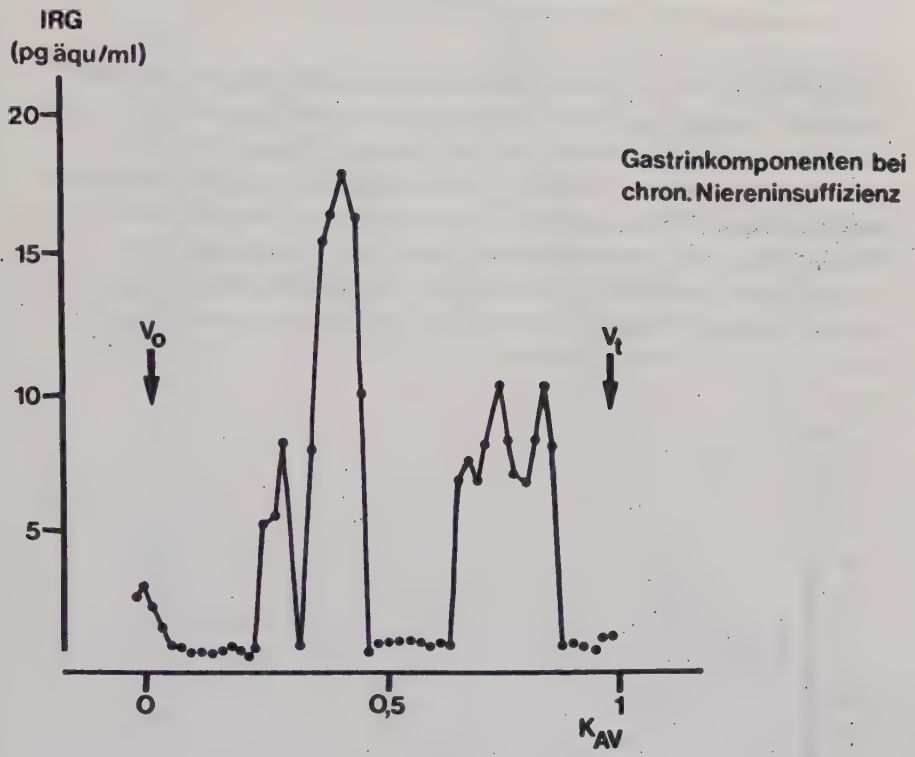

Abb. 15: Gastrinkomponenten im gepoolten Nüchternserum von vier Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz.

3. Gastrinkomponenten im Serum und gastrointestinaler Mukosa bei der Ratte:

a) Immunoidentität von synthetischem Humangastrin-17 und Gewebegastrin der Ratte:

In Abbildung 16 sind die gemessenen Gastrinkonzentrationen in einer Verdünnungsreihe mit Mukosaextrakt gegen die errechneten Werte aufgetragen. Die Punkte liegen auf der Winkelhalbierenden. Die B/B_o-Quotienten der Verdünnungskurve wurden gegen die gemessenen Konzentrationen aufgetragen. Man erhält einen Kurvenverlauf, der fast deckungsgleich ist mit der Eichkurve, die mit der Gastrin-Standardpräparation erstellt wurde (Abbildung 17). Es kann somit Immunoidentität angenommen werden.

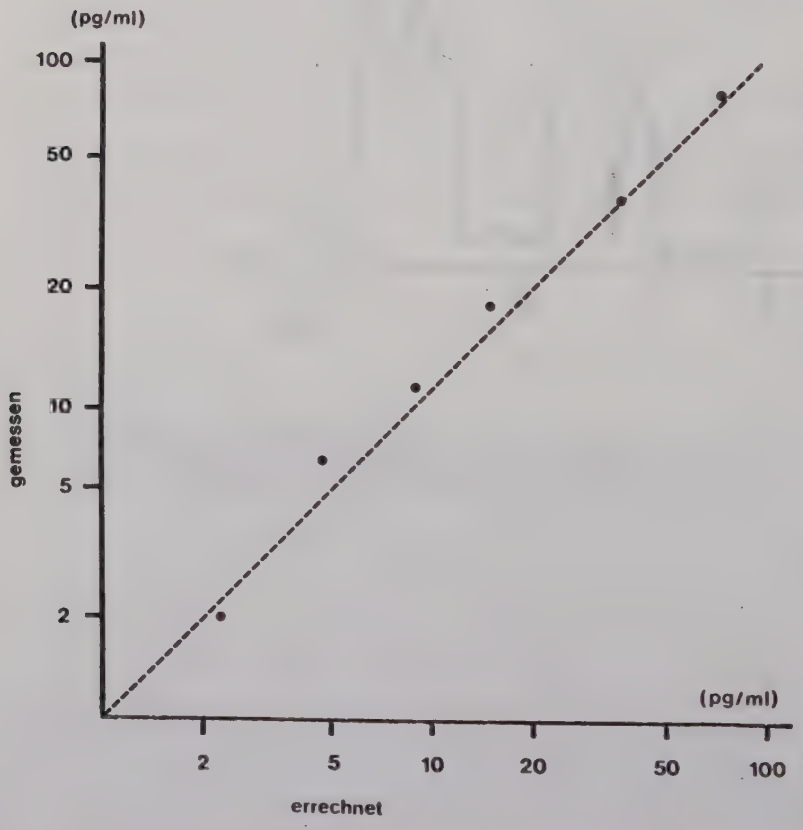

Abb. 16: Vergleich der errechneten und der gemessenen Gastrinkon-

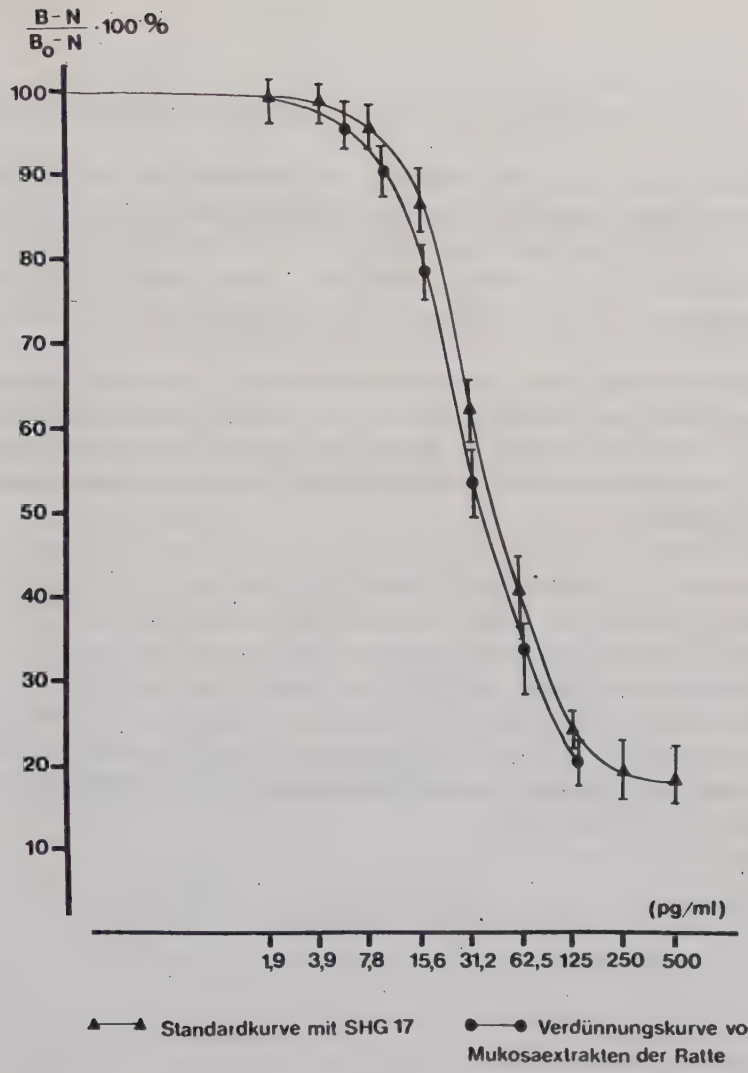

Abb. 17: Vergleich der Standardverdünnungsreihe (synthetisches Humangastrin ICI) mit einer Verdünnungsreihe aus einem Extrakt der gastrointestinalen Mukosa der Ratte.

b) Einfluß von Stress und/oder Vagotomie auf Serum-Gastrin:

Stress führte zu einer Erhöhung des Serumgastrin auf ca. den 3fachen Wert gegenüber dem Kontrollkollektiv (52, 59, 60, 61). Die Durchführung der Vagotomie ließ die Serumgastrinkonzentrationen auf das 8fache ansteigen. Zusätzlicher Stress nach Vagotomie konnte die Serumgastrinkonzentration nicht mehr verändern.
Nach der Gelfiltration des Kontrollserums finden wir Immunreaktivität an der Position von Gastrin-17 und Gastrin-14. Auch im Ausschlußvolumen läßt sich konstant bei allen eluierten Rattenseren eine verhältnismäßig hohe Immunreaktivität nachweisen.
Nach Stress finden wir einen Anstieg von Gastrin-17 und Gastrin-14. Zusätzlich erscheint noch ein dritter kleiner Peak, an einer Position zwischen Gastrin-34 und Gastrin-17. Der K_{av} beträgt 0,55. Auch nach Vagotomie bildet dieses "intermediäre" Gastrin einen deutlichen Peak bei einem zusätzlichen Anstieg von Gastrin-17 und Gastrin-14. Mini-Gastrin hat im Gegensatz zum Menschen einen verhältnismäßig großen Anteil an der Gesamt-Immunreaktivität (siehe Abbildung 18 und Tabelle 8).

Tabelle 8

Verteilung der Immunreaktivität (Serum der Ratte)

	Intermed. G	G-17	G-14	gesamt (1)
Kontrolle	-	25,0	19,2	41,9 (pg/ml)
Stress	25,1	47,5	34,9	119
Vagotomie	29,8	80,5	54,2	323
Vagotomie und Stress	23,0	71,9	39,7	310

Kontrolle	-	56,6 %	43,3 %
Stress	23,3 %	44,2 %	32,5 %
Vagotomie	18,1 %	48,9 %	32,9 %
Vagotomie und Stress	17,0 %	53,3 %	29,5 %

(1) gemessen im Serum mit AK. 2604

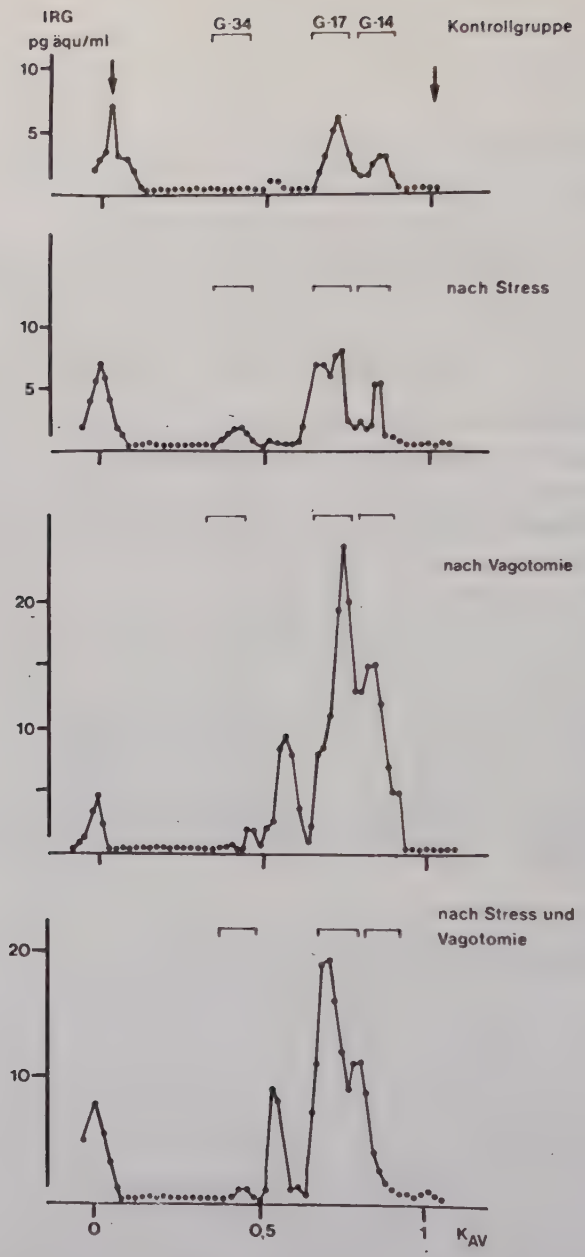

Abb. 18: Gelchromatographisch getrennte Gastrinkomponenten in gepoolten Seren von gestreßten, vagotomierten sowie gestreßten und vagotomierten Ratten.

c) Gastrinkomponenten in der gastrointestinalen Mukosa bei Ratten:

Im Antrum wurde nach Stress ein deutlicher Anstieg der Gastringewebskonzentration gemessen. Nach Durchführung der Vagotomie lag die Gewebskonzentration noch höher; sie betrug ca. das 2 1/2fache der Kontrollgruppe. Zusätzlicher Stress zur Vagotomie brachte keinen weiteren Anstieg. Im Fundus fanden sich erhöhte Konzentrationen sowohl nach Stress als auch nach Vagotomie. Jedoch fand sich zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied. Keinen Einfluß hatten die Versuchsbedingungen auf die Gastrinkonzentration im Duodenum (51, 67).
Bei der Gelchromatographie findet man in allen untersuchten Geweben ein uniformes Komponentenmuster. Durchschnittlich 85 % der Immunreaktivität werden an der Position zwischen Gastrin-34 und Gastrin-17 eluiert. An derselben Position wurde bereits im Serum Immunreaktivität gefunden. Wegen der Elutionsposition zwischen G-34 und G-17 wird diese Komponente als "intermediäres" Gastrin bezeichnet. In einigen Gewebeextrakten läßt sich noch Gastrin-17 als kleiner Peak nachweisen, Gastrin-14 ist im Gewebe nicht sicher nachzuweisen. An der Position von Gastrin-34 lassen sich nur minimale Konzentrationen messen, somit scheint die Existenz einer dort eluierten Komponente fraglich. Die Zunahme der Gastrinkonzentrationen nach den verschiedenen Versuchsbedingungen verändert das Verhältnis der Komponenten untereinander nicht wesentlich (siehe Abbildungen 9 und 21 und Tabelle 7).

Tabelle 8: Verteilung der Gastrinimmunreaktivität (Mukosa-extrakte der Ratte)

	intermed.G.	G-17	G-14	Gewebekonzentration
Antrum				
Kontrolle	79,1 %	11,6 %	9,3 %	2801 µg/g Gewebe
Stress	92,9 %	3,8 %	3,3 %	4458
Vagotomie	96,2 %	2,1 %	1,3 %	6922
Vagotomie und Stress	94,0 %	3,1 %	2,9 %	5497
Fundus				
Kontrolle	90,8 %	6,5 %	2,7 %	18
Stress	95,6 %	4,4 %	-	40
Vagotomie	85,6 %	8,1 %	6,3 %	57
Vagotomie und Stress	94,8 %	4,1 %	1,1 %	68
Duodenum:				
Kontrolle	86,1 %	7,6 %	6,3 %	201
Stress	84,7 %	8,4 %	6,7 %	213
Vagotomie	89,5 %	6,1 %	4,3 %	176
Vagotomie	98,3 %	1,3 %	0,4 %	220

RATTENMUKOSA : FUNDUS

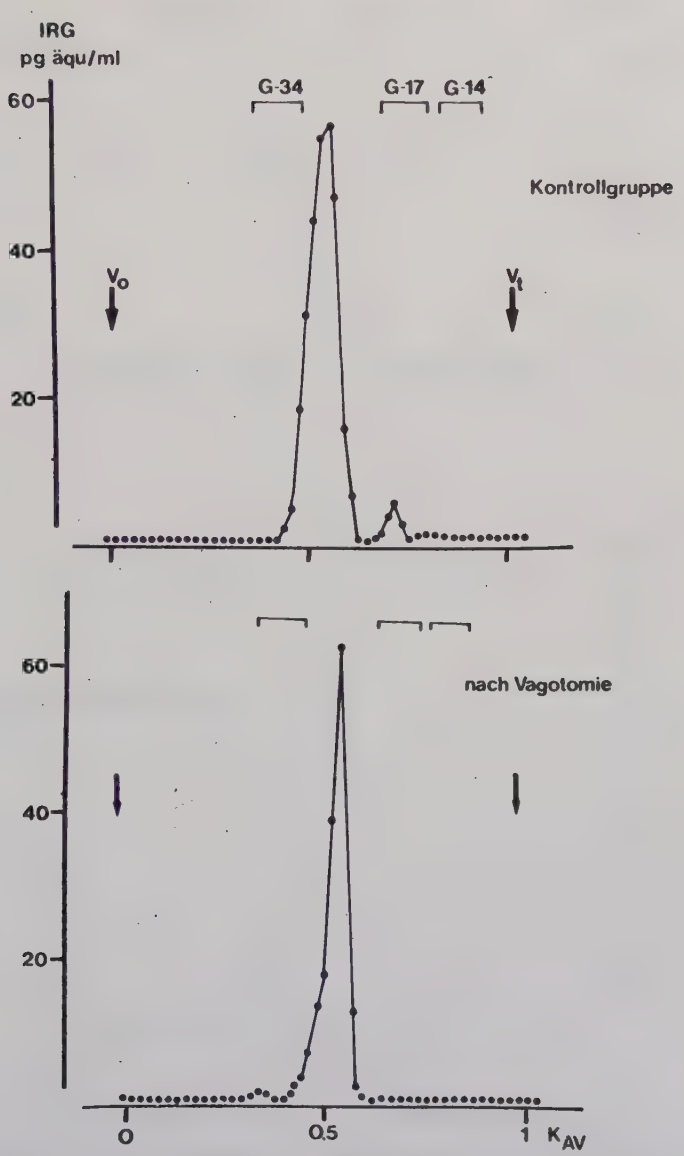

Abb. 19: Gelchromatogramme von Gewebsgastrin aus Ratten-Fundus bei Kontrolltieren und bei vagotomierten Ratten.

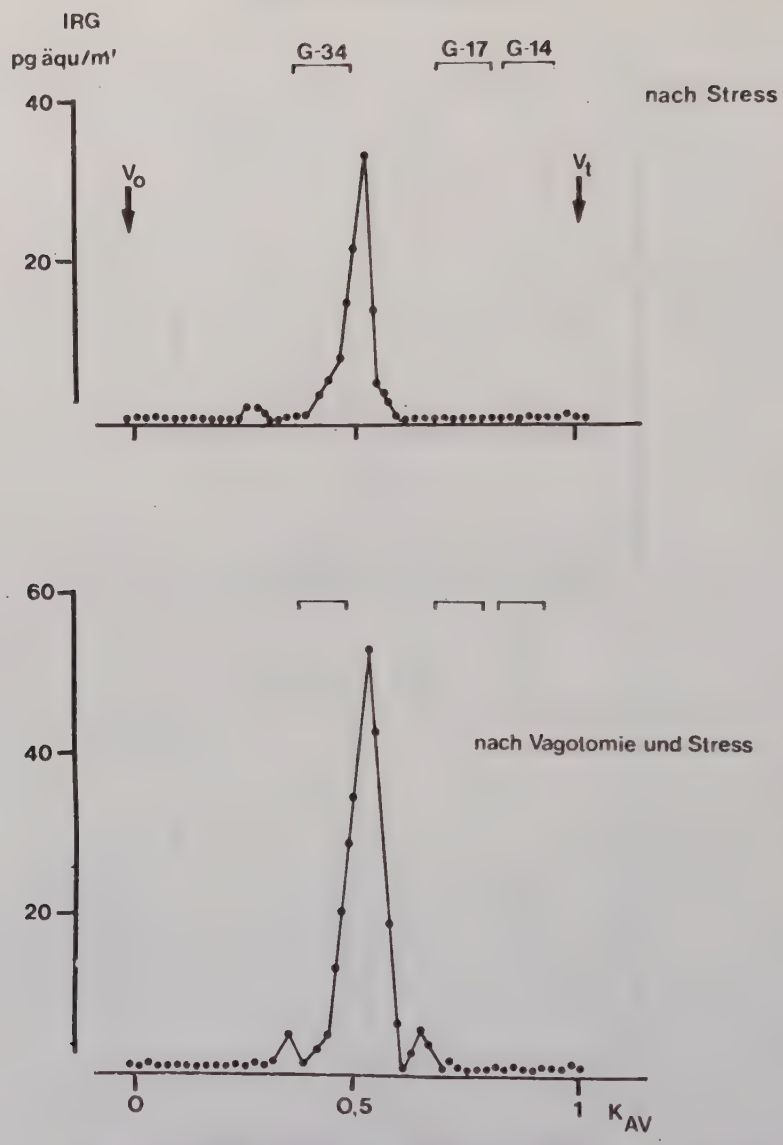

Abb. 20: Gelchromatogramme von Gewebsgastrin aus Ratten-Fundus bei gestreßten Ratten und bei Ratten nach Vagotomie und Stress.

RATTENMUKOSA : ANTRUM

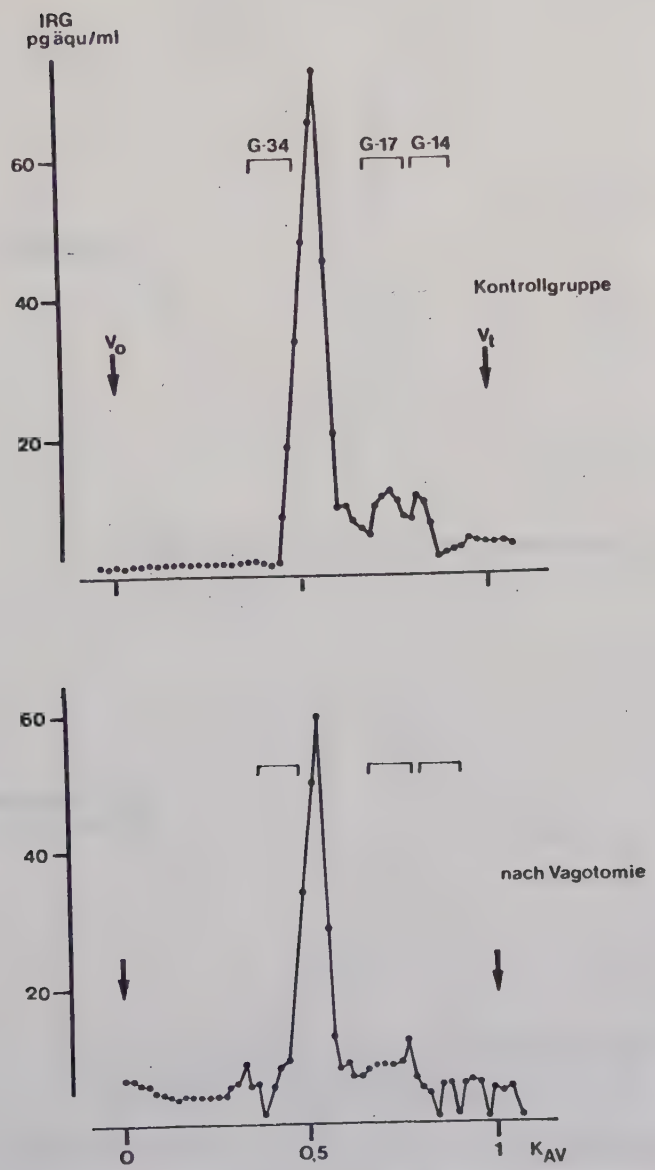

Abb. 21: Gelchromatogramme von Gewebsgastrin aus Ratten-Antrum bei Kontrolltieren und bei vagotomierten Ratten.

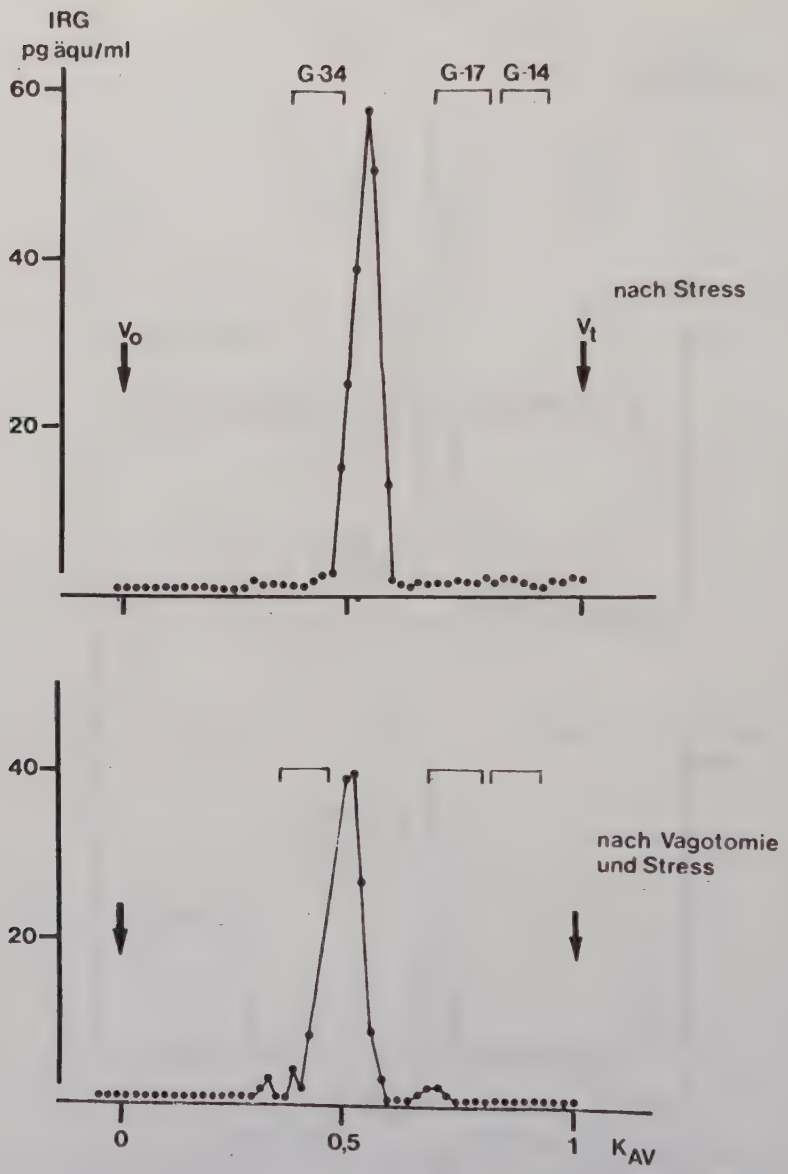

Abb. 22: Gelchromatogramme von Gewebsgastrin aus Ratten-Antrum bei gestreßten Tieren und bei Tieren nach Vagotomie und Stress.

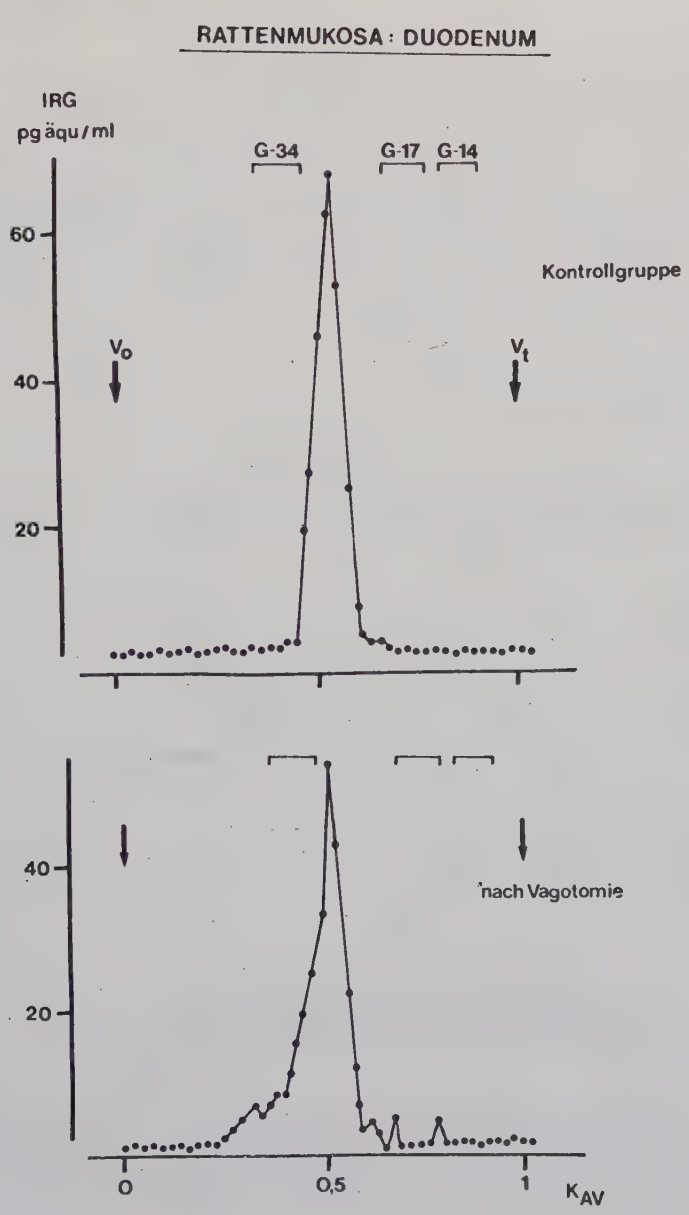

Abb. 23: Gelchromatogramme von Gewebsgastrin aus Ratten-Duodenum bei Kontrolltieren und bei vagotomierten Ratten.

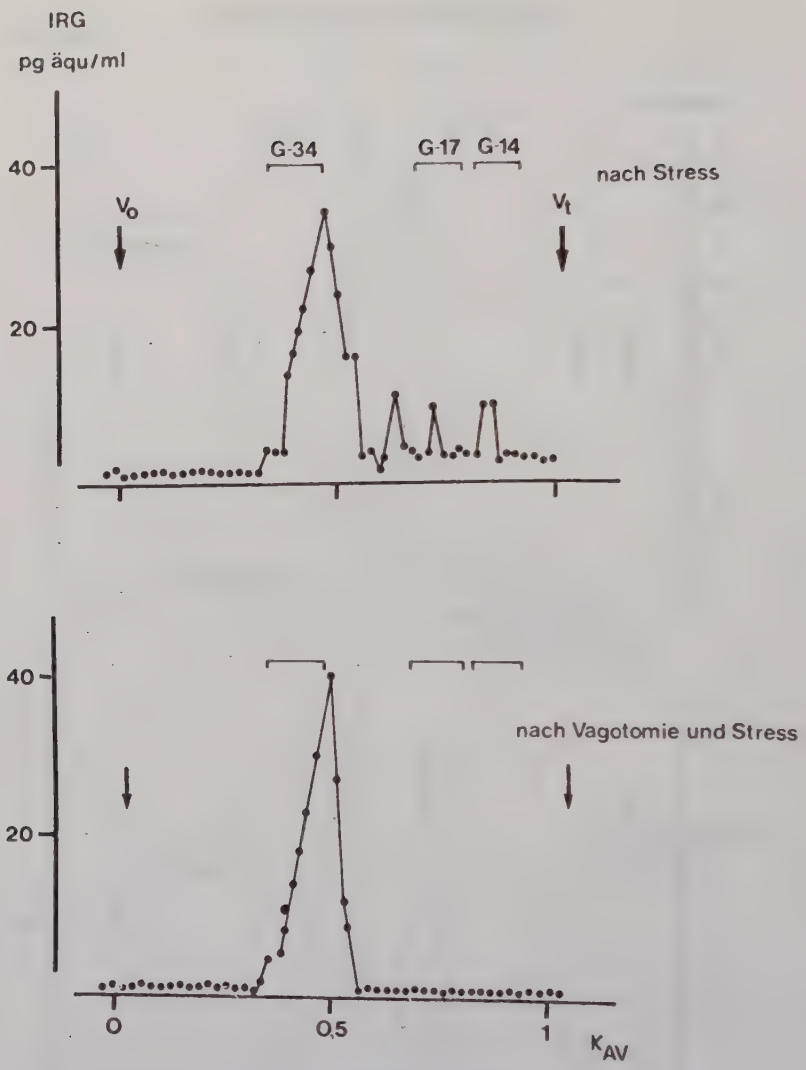

Abb. 24: Gelchromatogramme von Gewebsgastrin aus Ratten-Duodenum bei gestreßten Tieren und bei Tieren nach Vagotomie und Streß.

E. DISKUSSION

In der Literatur wird das Verfahren der Gelchromatographie zur Trennung der Gastrinkomponenten am häufigsten beschrieben (42, 89, 91, 95, 101, 118, 125, 126). Sie stellt ein relativ einfaches und billiges Verfahren dar. Zur Evaluierung der in dieser Arbeit gewählten Methodik wurde das Serum eines Patienten mit atrophischer Gastritis, das eine extrem hohe Gastrinkonzentration aufwies, ausgesucht. Es ließ sich mit der überlangen Säule (10 x 2000 mm) ein gutes Ergebnis erzielen. Wie aus der Abbildung 6 a zu ersehen ist, lassen sich die 4 Hauptkomponenten deutlich trennen. Die sulfatierten und nicht-sulfatierten Unterformen der Komponenten konnten dagegen nicht voneinander getrennt werden. Das Ergebnis der kürzeren Chromatographiesäule (16 x 1000 mm) konnte hingegen nicht überzeugen (Abbildung 6 b). Trotz der hohen Gastrinkonzentration war "Component I" nicht mehr nachweisbar; Gastrin-17 erschien nur als kleiner "peak". Da in der vorliegenden Arbeit Seren mit niedriger Gastrinkonzentration verarbeitet werden sollten, wurde eine lange Chromatographiesäule mit geringem Gelbettvolumen gewählt. Die Elutionsorte wurden als K_{AV}-Wert angegeben, um unabhängig von der Säulengeometrie zu sein. Die K_{AV}-Werte dieser Arbeit sindgut vergleichbar mit den Ergebnissen von Rehfeld et al. (88). In dieser Arbeit werden Bereiche angegeben, in denen die Unterformen der aufgetrennten Komponenten eluiert werden.

Tabelle 9: K_{AV}-Werte der Gastrinkomponenten (Sephadex G 50 sf-Chromatographiesäulen)

	Ergebnisse von Rehfeld et al.(85)	Eigenes Ergebnis
Comp. I	0,12 - 0,34	0,33
G - 34	0,41 - 0,56	0,51
G - 17	0,66 - 0,78	0,75
G - 14	0,87 - 0,97	0,90

Die Arbeitsgruppe von Rehfeld (88) verwendete in dieser Arbeit eine Chromatographiesäule mit den Abmessungen 25 x 2000 mm. Durch das vergrößerte Säulenvolumen bei sehr kleinen Fraktionsvolumina war es möglich, bei Seren mit hoher Gastrinkonzentration eine sehr subtile Trennung der Gastrinkomponenten zu erreichen. Die von Rehfeld angegebene Trennschärfe - ausgedrückt als EHTP (siehe B 1 b)- betrug 0,36. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Wert von 0,70 errechnet an einem "peak" des eluierten Gastrin-34. Da Gastrin-34 wahrscheinlich keine molekulareinheitliche Substanz ist, dürfte die tatsächliche Differenz wohl geringer sein.

Bei Patienten mit einer Hypergastrinämie aufgrund einer chronisch-atrophischen Gastritis (105) zeigt das Chromatogramm als vorherrschende Komponente Gastrin-34 (Abb. 6). Das eigentlich biologisch-aktive Gastrin-17 stellt nur ein Drittel der gesamten Immunreaktivität dar. Sowohl "Component I" als auch Gastrin-14 sind in geringer Konzentration vorhanden. Das hier vorliegende Ergebnis stimmt mit den Arbeiten von Rehfeld et al.(91) und Yalow et al.(125) überein.

Beim Zollinger-Ellison-Syndrom führt die autonome Gastrinproduktion zu massiv erhöhten Serum-Gastrin-Konzentrationen (10, 56, 83, 102, 116, 118, 122). Das Komponentenmuster im Serum und im Gastrinomgewebe wurde bereits vielfach untersucht (22, 32, 40, 56, 89, 95, 116, 117). Im Serum können wiederum alle 4 Hauptkomponenten nachgewiesen werden. Es finden sich bei den untersuchten Patienten individuelle Unterschiede im Komponentenmuster , jedoch entfälltder Hauptteil der Immunreaktivität meist auf Gastrin-34 (vergleiche Abbildung 7 und 8). Die Verteilung der Komponenten im Serum entspricht nicht der im Gastrinomgewebe. Dort ist Gastrin-17 die

vorherrschende Komponente. Das Tumorgewebe weist eine relativ geringe Gastrinkonzentration auf. Ursache ist vermutlich eine verminderte Speicherfähigkeit (22). Zusätzlich fand man im Serum und Tumorextrakten von Patienten mit Zollinger-Ellison-Syndrom ein biologisch-inaktives Gastrinfragment. Es besteht aus den 13 N-terminalen Aminosäuren von Gastrin-17 (32). Da die in dieser Arbeit verwendeten spezifischen Antiseren sich an die C-terminalen Aminosäuren binden, konnte dieses Gastrinfragment nicht erfaßt werden (90). Die Bedeutung dieses Gastrinfragmentes ist bisher unklar. Von Rehfeld und Mitarbeitern (96) wird außerdem über ein makromolekulares Gastrin berichtet, das ebenfalls in Tumorextrakten und im Serum bei Patienten mit Zollinger-Ellison-Syndrom nachweisbar sein soll. Durch Rechromatographie zeigte sich, daß keine molekulareinheitliche Substanz vorliegt. Der Molekulargewichtsbereich reicht von 30 000 - 100 000. In der vorliegenden Untersuchung war bei der Chromatographie von Zollinger-Ellison-Seren im Ausschlußvolumen keine eindeutige Immunreaktivität nachweisbar, die einem solchen "big,big gastrin" entspricht. Zudem muß die unspezifische Interferenz der Serum-Albumine, die ebenfalls im Ausschlußvolumen eluiert werden , in Betracht gezogen werden (vergleiche Abbildung 5 a)(100). Der Arbeit von Rehfeld ist auch zu entnehmen, daß das Vorkommen von "big,big gastrin" beim Zollinger-Ellison-Syndrom kein konstanter Befund ist.

Wegen der niedrigen Gastrinkonzentration im Serum g e s u n d e r P r o b a n d e n war es anfangs sehr schwierig, brauchbare Chromatogramme zu erstellen. Wurde ein zu großes Probevolumen auf die Säule aufgebracht, verminderte sich die Trennschärfe durch die breite Startzone. Vom Hersteller des Sephadex-Geles wird empfohlen, daß das maximale Probevolumen 2 % des Gelbettvolumens nicht überschreiten sollte. Dies entsprach bei der in dieser

Arbeit verwendeten Chromatographiesäule 3 ml Serum. Jedoch waren auch dabei die in den Fraktionen zu messenden Gastrinkonzentrationen noch so gering, daß sie im flachen Anfangsteil der Eichkurve abgelesen wurden. Somit beeinflußten selbst geringe Meßfehler im Radioimmunoassay das Aussehen des Chromatogrammes erheblich.
Yalow und Berson (124, 125) berichteten, daß die Hauptkomponente im Nüchternserum Magengesunder das makromolekuläre "big,big gastrin" sei. Eine ähnliche Mitteilung stammt von Brady und McGuigan (12). Rehfeld et al.(96) konnten dagegen zeigen, daß im Serum Magengesunder keine makromolekulare Gastrinkomponente existiert. Man beobachtete nämlich, daß nach Entfernung des immunreaktiven Gastrin aus dem Serum durch Immunabsorbtion bei anschließender Chromatographie unverändert "big,big gastrin" eluiert wurde, Gastrin-17 jedoch nicht mehr nachweisbar war. Da die Arbeitsgruppe zudem zeigen konnte, daß Serum-Proteine, wie Albumine und Immunglobulin G, mit den Messungen des Radioimmunoassay interferieren, konnten sie beweisen, daß "big,big gastrin" in diesem Falle ein Artefakt ist. Vor allem bei kleinen Chromatographiesäulen und relativ großen Probevolumina - wie dies in der Arbeit von Yalow und Wu (124) der Fall war - ist im Ausschlußvolumen eine relativ hohe Albuminkonzentration und somit auch die unspezifische Interferenz verstärkt.
Dockray und Taylor (30) publizierten eine "Subtraktionsmethode" mit 2 Antikörpern zur Quantifizierung der Gastrinkomponenten. Ein Antikörper war gegen das C-terminale Ende gerichtet und maß somit alle 4 Komponenten. Das andere Antiserum, das nur das N-terminale Ende von Gastrin-17 erkannte, erfaßte diese Komponente selektiv. Die erhaltene Differenz setzten die Autoren gleich der Konzentration von Gastrin 34. "Component I" und Gastrin-14 wurden wegen ihrer geringen Konzentrationen vernachlässigt (30, 31).

Nach ihren Ergebnissen besteht die Immunreaktivität im Nüchternserum fast ausschließlich aus Gastrin-17 (30). Nach Stimulation mit einer Testmahlzeit erfolgte ein steiler Anstieg von Gastrin-17. Der Anstieg von Gastrin-34 erfolgte später, 50 Minuten nach Testmahlzeit erreichte Gastrin-34 die höchste Konzentration. Sie betrug das zweifache von Gastrin-17.
Die Arbeitsgruppe von Stadil (99) verwendete in ihrer Studie eine Chromatographiesäule mit gleichen Abmessungen wie in der vorliegenden Arbeit. Das verwendete Gastrin-Antiserum 2604 bindet alle vier Gastrinkomponenten gleichmäßig (74). Die Arbeitsgruppe fand bei gesunden Probanden im Nüchternserum ein Vorherrschen von Gastrin-34. Der postprandiale Gastrinanstieg geschah nur durch die Zunahme von Gastrin-17. Gastrin-34 blieb postprandial unverändert; nach 30 Minuten sank die Konzentration sogar leicht ab. 30 Minuten nach Einnahme der Testmahlzeit waren die Konzentrationen von Gastrin-34 und Gastrin-17 ungefähr gleich.
Lamers et al. (64) stellten kürzlich ein Verfahren vor, Gastrin vor der Gelchromatographie durch Affinitätschromatographie zu extrahieren und zu konzentrieren. Die gemessene Gastrinkonzentration mußte anschließend um die unspezifische Interferenz im Serum sowie um die verminderte Bindungsfähigkeit des verwendeten Antiserums für die größeren Gastrinmoleküle korrigiert werden. Dieses Verfahren sollte bei Seren mit niedriger Gastrinkonzentration bessere Ergebnisse liefern. Lamers und Mitarbeiter (64, 65) fanden im Nüchternserum bei gesunden Personen wiederum ein Überwiegen von Gastrin-34 gegenüber Gastrin-17. Zum Zeitpunkt der "peak"-Konzentration des gesamten Serum-Gastrins, also bis 20 Minuten postprandial, wurden von den Autoren bisher nicht untersucht. Aus diesem Grunde

sind ihre Angaben mit den übrigen Arbeiten schlecht vergleichbar. Die Blutentnahmen wurden in dieser Arbeit 45 Minuten nach der Testmahlzeit ausgeführt. Im Chromatogramm erkennt man dann einen Anstieg beider Komponenten, wobei vor allem Gastrin-17 seinen Ausgangswert vervierfachen konnte, die Konzentrationen von Gastrin-34 und Gastrin-17 sind jedoch ungefähr gleich.
Bezüglich des Komponentenmusters im Nüchtern-Serum gesunder Probanden findet sich in den bisherigen Veröffentlichungen keine sichere Übereinstimmung. Die Schwierigkeiten, bei niedriger Gastrinkonzentration exakte Chromatogramme zu erhalten, sind offensichtlich. Auch die methodischen Änderungen von Dockray (30) und Lamers (64) bringen methodische Fehler mit sich.Als einzige Übereinstimmung zeigt sich in den zitierten Veröffentlichungen sowie in der hier vorliegenden Arbeit (Abb. 9), daß der unmittelbar postprandiale Anstieg des Serum-Gastrins durch eine Zunahme von Gastrin-17 bedingt ist, während Gastrin-34 erst später, ca. 1 Stunde nach Testmahlzeit,seine maximale Konzentration erreicht.

Bei der Magensekretionsanalyse mit dem Pentagastrintest haben Patienten mit rezidivierendem U l c u s d u o d e n i im Mittel eine höhere basale und stimulierte Säuresekretion im Vergleich zu magengesunden Kontrollpersonen (10, 36). Die Gastrinkonzentration im Nüchternserum zeigt dagegen keinen signifikanten Unterschied; erst die postprandiale Gastrinantwort liegt deutlich höher und kehrt später zu den Ausgangswerten zurück als bei einem Kontrollkollektiv (10, 50, 122). In diesem Zusammenhang interessierte vor allem, ob die erhöhte basale und stimulierte Säuresekretion auf die Freisetzung der biologisch-aktiveren Gastrinkomponenten zurückzuführen sei?

(24, 118, 119). Stadil und Mitarbeiter (99) veröffentlichten ein entsprechendes Ergebnis. Sie fanden bei Patienten mit Ulcus duodeni einen quantitativ höheren Anstieg von Gastrin-17 im Vergleich zu magengesunden Personen. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit (siehe Abbildung 10) stimmen jedoch eher mit den Ergebnissen von Dockray und Taylor (29, 30, 31) überein. Diese Arbeitsgruppe fand im Gegensatz zu Stadil et al. (99) einen höheren Anstieg von Gastrin-34. Dabei erreichte Gastrin-34 bereits früher die "peak"-Konzentration (30 Minuten nach Testmahlzeit), während bei Kontrollpersonen Gastrin-34 erst 50 Minuten postprandial die höchste Konzentration erreichte; Gastrin-17 dagegen zeigte im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen keinen Unterschied.

Lamers et al. (64) schließlich fanden im Nüchternserum ein ähnliches Gastrinprofil bei gesunden Kontrollpersonen und bei Patienten mit Ulcus duodeni. Dabei überwog Gastrin-34 deutlich. Postprandial sahen sie einen Anstieg beider Komponenten, wobei vor allem Gastrin-17 den Ausgangswert verdreifachen konnte, während Gastrin-34 den Ausgangswert nur verdoppelte. Die absolute Konzentration von Gastrin-34 war jedoch noch gering höher. Lamers et al.(64) konnten in ihren Untersuchungen auch minimale Konzentrationen von "Component I" und Gastrin-14 nachweisen.

Auch die bisher veröffentlichten Untersuchungen bezüglich des Gastrinkomponentenmusters bei Patienten mit Ulcus duodeni zeigen kein einheitliches Bild. Da die Bestimmung des postprandialen Gastrinprofils jeweils zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Testmahlzeit erfolgte, bleibt auch eine Deutung der Befunde schwierig. Jedoch ist anzunehmen,

daß die Säurehypersekretion bei Patienten mit Ulcus duodeni nicht auf eine vermehrte Freisetzung des biologisch-aktiveren Gastrin-17 zurückzuführen ist (20, 99).
Als mögliche Ursache der Hypersekretion fand man, daß die Parietalzelle bei Patienten mit Ulcus duodeni eine höhere Empfindlichkeit sowohl gegenüber Pentagastrin, als auch gegenüber Gastrin-17 und Gastrin-34 besitzt (36, 55, 114). Das heißt, daß die Gastrindosis, die für die halbmaximale Rate der Säurestimulation notwendig ist, bei gesunden Personen dreimal höher ist als bei Patienten mit Ulcus duodeni.
Die höhere postprandiale Gastrinantwort bei Patienten mit Ulcus duodeni ist wohl auf einen gestörten "Säure-feed-back" zurückzuführen. Walsh und Mitarbeiter (113) fanden nämlich, daß bei Ulkuspatienten die Gastrinhemmung bei niedrigem pH signifikant geringer ist als bei Gesunden. Für diese funktionell höhere Aktivität der G-Zelle spricht auch der Befund von Creutzfeld et al. (21). Sie fanden nämlich, daß die antralen G-Zellen von Patienten mit Ulcus duodeni ultrastrukturell signifikant mehr helle, "leere" Granula aufwiesen als die G-Zellen von Normalpersonen. Für eine erhöhte G-Zelldichte oder einen erhöhten antralen Gastringehalt beim normogastrinämischen Ulcus duodeni fanden sich bisher keine eindeutigen Ergebnisse (3, 20, 39, 76, 118).

V a g o t o m i e reduziert die basale und stimulierte Magensäuresekretion (5, 10, 61). Demgegenüber besteht eine inverse Erhöhung des Serum-Gastrin (10, 116). Die postprandiale Gastrinantwort ist auch gegenüber Patienten mit Ulcus duodeni höher und länger (10). Die Art der Vagotomie (selektiv-proximal mit oder ohne Pyloroplastik, gastrale und trunkuläre Vagotomie) ergeben keinen wesentlichen Unterschied in Bezug auf die Serum-Gastrinkonzentration (10, 60, 61, 70, 79). Die Veränderungen des Säure- und Gastrinverhaltens sind als Langzeiteffekt der Vagotomie anzusehen

(70). Als unmittelbare Ursache der vagotomie-induzierten Hypergastrinämie sind vermutlich mehrere Faktoren beteiligt. Durch die Reduktion der Säuresekretion resultiert eine verminderte Hemmung der Gastrinfreisetzung. Außerdem gibt es Hinweise, daß der N. vagus auch inhibitorische Fasern für die Gastrinfreisetzung enthält (11, 44, 45, 83). Diesen hemmenden Einfluß des Vagus auf die Gastrinfreisetzung mußte man vermuten, als man nach pharmakologischer Vagolyse mit Atropin einen höheren postprandialen Gastrinanstieg bei gesunden Probanden und bei Vagotomie-Patienten beobachtete (48, 115). Außerdem konnte nach Atropingabe eine Gastrinantwort auf eine Scheinfütterung bei Kontrollpersonen gefunden werden (35). Da jedoch auch bei selektiv-proximaler Vagotomie, bei der die Innervation des Antrums intakt bleibt, ebenfalls eine Hypergastrinämie beobachtet wird, muß dieser depressorische Effekt indirekt, vielleicht über einen Transmitter, erfolgen (118).
Nach den hier vorliegenden Ergebnissen (Abbildung 11 - 13) war der Anstieg des Serumgastrin nach Vagotomie vor allem durch eine Zunahme von Gastrin-34 sowohl im Nüchternserum als auch im postprandialen Serum bedingt. Dieser Befund war jedoch erst 3 Monate, bzw. 12 Monate postoperativ ausgeprägt. Stadil et al (101) fanden bei der Untersuchung der Serum-Gastrinkomponenten nach Vagotomie ein Überwiegen von Gastrin-17, das im Gegensatz zu den hier vorliegenden Befunden vor allem postprandial stark anstieg. Dazu ist jedoch anzumerken, daß die Chromatographie nur mit einer 1 Meter langen Säule durchgeführt wurde. Dadurch konnten Gastrin-17 und Gastrin-34 nicht in zwei separate "peaks" getrennt werden. Außerdem lagen zwischen Operation (trunkuläre und selektiv-proximale Vagotomie) und Blutentnahme nur 14 Tage -also zu einem Zeitpunkt, an dem die Postvagotomie-Hypergastrinämie noch nicht die maximale Serumkonzentration erreicht hat (10).

Im Magenantrum findet man nach Vagotomie bei erhöhter Gewebsgastrinkonzentration ein unverändertes Komponentenmuster (77). Die Gesamt-Immunreaktivität fällt unverändert zu ca. 95 % auf Gastrin-17. Der Rest ist Gastrin-34 zuzuordnen. In der Mucosa des Duodenums sind Gastrin-17 und Gastrin-34 in ungefähr gleicher Konzentration vorhanden, postoperativ verschiebt sich das Verhältnis zugunsten von Gastrin-34, dessen Anteil nun ca. 65 % beträgt (77). Wie ist aber das veränderte Serumkomponentenmuster nach Vagotomie zu erklären, obwohl das Komponentenmuster in der antralen Mucosa, die vermutlich alleine für die Gastrinfreisetzung verantwortlich ist, unverändert bleibt ? Beim Wachstumshormon, bei Glucagon und bei Insulin, findet man bei lang andauernder Stimulation eine vermehrte Sekretion der größeren Molekülformen, bzw. der Hormonvorstufen (16, 38, 62). Da die als Langzeiteffekt resultierende verminderte Magensäuresekretion für die G-Zellen einen Dauerstimulus darstellt, kann man für Gastrin wohl auf einen analogen Mechanismus schließen und damit das relative Überwiegen von Gastrin-34 nach Vagotomie erklären.

Von der normogastrinämischen Ulkuskrankheit sind Ulzera mit erhöhtem basalen Serumgastrin abzugrenzen. Eine wichtige Differentialdiagnose ist die antrale G-Zell-Hyperplasie, die in erster Linie vom Zollinger-Ellison-Syndrom abgegrenzt werden muß (27, 66, 68). Die antrale G-Zell-Hyperplasie weist neben einer ulkustypisch erhöhten Magensäuresekretion eine leicht bis mäßig erhöhte basale Serumgastrinkonzentration auf (10). Diese stieg postprandial im Gegensatz zum Zollinger-Ellison-Syndrom deutlich überhöht an (10). Die Diagnose "antrale G-Zell-Hyperplasie" ist durch immunhistochemische Untersuchungen endoskopisch entnommener Antrumbiopsien

möglich. Mit der Peroxidase - Antiperoxidase-Methode kann in den Biopsien eine Vermehrung der gastrinimmunreaktiven Zellen der basalen und mitleren Drüsenabschnitte des Antrums nachgewiesen werden (66, 68). Da die Vagotomie bei der antralen G-Zell-Hyperplasie die Magensäure nicht zu beeinflussen scheint und es zu Rezidiv-Ulzerationen kommt, ist für die chirurgischen Differentialtherapie der Ulkuskrankheit praeoperativ die Durchführung einer Gastrindiagnostik zu fordern (68).
Die gelchromatographische Untersuchung der Serumgastrinkomponenten von Patienten mit nachgewiesener antraler G-Zell-Hyperplasie zeigt , daß im Nüchternserum dieser Patienten alle vier Hauptkomponenten zu finden sind , jedoch auf "Component I" und Gastrin-14 ein minimaler Anteil entfällt (Abbildung 14). Es findet sich unmittelbar nach der Testmahlzeit ein Anstieg von Gastrin-17. Gastrin-17 bleibt auch nach 60 Minuten die vorherrschende Komponente, obwohl Gastrin-34 den prozentualen Anteil an der Gesamtimmunreaktivität wieder vergrößern kann. Die antrale G-Zelle antwortet also auf den physiologischen Nahrungsreiz mit der Freisetzung von Gastrin-17 analog dem Befund bei magengesunden Personen. Die postprandiale Gastrinantwort unterscheidet sich also qualitativ gegenüber Patienten mit Ulcus duodeni (Abbildung 10) und Patienten nach Vagotomie (Abbildung 11 - 13). Vergleichbare Untersuchungen sind bisher nicht veröffentlicht.

Die Niere wird als eines der wichtigsten Organe des Gastrinkatabolismus angesehen. Diesen Schluß zog man aus den erhöhten Serum-Gastrinkonzentrationen bei Patienten mit c h r o n i s c h e r N i e r e n i n s u f f i z i e n z (42, 49, 51, 73, 107, 121).Folgende Beobachtungen belegen dies ebenfalls: Bei Ratten führt eine doppelseitige Nephrektomie zu einem Anstieg der Serumgastrinkonzentration, beidseitige Ureterenligatur verändert

jedoch die Gastrinkonzentration nicht (19, 23). Nach Nierentransplantation fallen erhöhte Serum-Gastrin-Konzentrationen wieder auf Normwerte ab (82). In der Niere läßt sich eine arterio-venöse Differenz des stimulierten Serumgastrin messen (127).
Im Tierversuch wurde bereits der Einfluß der Nierenpassage auf die Serum-Gastrinkomponenten untersucht. Thompson et al. (109) hielten für den wesentlichen Effekt der Nierenpassage, daß vor allem Gastrin-34 reduziert wird. Da im Urin nur eine geringe Gastrinimmunreaktivität nachweisbar ist, muß man einen enzymatischen Abbau im Nierenparenchym annehmen (116).
Das Komponentenmuster im Serum von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz zeigt eine Zunahme der Gastrinkomponenten mit hohem Molekulargewicht (Abbildung 15). Dabei erscheint "Component I" überproportional erhöht, der größte Anteil der Immunreaktivität entfällt auf "big gastrin". Hällgren und Mitarbeiter (48) fanden bei der Elution des Serums eines Einzelpatienten mit chronischer Niereninsuffizienz ebenfalls als vorherrschende Komponente Gastrin-34, das nach ihrer Berechnung ca. 60 % der Gesamtimmunreaktivität ausmachte. Sie konnten jedoch in der Position von "Component I", Gastrin-17 und Gastrin-14 keine eindeutigen "peaks" nachweisen. Ihre Ansicht, daß dieses Komponentenmuster bei chronischer Niereninsuffizienz dem magengesunder Personen ähnlich sei, kann nicht geteilt werden, da im Serum Magengesunder keine überproportionale Erhöhung dieser großen Molekülformen besteht (siehe Abbildung 9).
Auch bei anderen Peptidhormonen mit molekularer Heterogenität, die von der Niere abgebaut werden, wird eine ähnliche Umverteilung beschrieben. Kuku et al. (62) fanden bei Glucagon im Serum niereninsuffizienter Patienten ebenfalls eine überproportionale Zunahme der größeren Molekülformen.

In der hier vorliegenden Untersuchung (siehe Abbildung 15) fällt vor allem die niedrige Wiederfindungsrate nach Chromatographie auf. Sie betrug hier nur ca. 50 % der gesamten eingesetzten Immunreaktivität, während bei anderen untersuchten Seren die Wiederfindungsrate zwischen 80 und 120 % liegt. Da dies nicht allein durch die verminderte Bindungsfähigkeit des spezifischen Antiserums für "Component I" und Gastrin-34 erklärbar ist, scheint es vielmehr möglich, daß durch die Verschiebung des pH-Wertes oder durch die erhöhten harnpflichtigen Substanzen im Serum eine unspezifische Interferenz im Radioimmunoassay verursacht wird und deshalb falsch-erhöhte Serumgastrinkonzentrationen gemessen werden.
Es steht jedoch außer Frage, daß der Gastrinkatabolismus durch chronische Niereninsuffizienz beeinflußt wird, da ein anderes Komponentenmuster gefunden wird. Nach den vorliegenden Befunden und Literaturangaben (49, 67, 109, 116) muß man vor allem annehmen, daß die größeren Gastrinkomponenten, also "Component I" und Gastrin-34, verzögert katabolisiert werden. Die klinische Relevanz der Hypergastrinämie bei chronischer Niereninsuffizienz ist nicht eindeutig geklärt (81, 107, 121). Eine direkte oder indirekte Korrelation zwischen Serumgastrinkonzentrationen und Magensäuresekretion konnte jedenfalls nicht errechnet werden (10).

S t r e s s b e d i n u n g e n führen bei verschiedenen Säugetieren und auch beim Menschen über die Katecholaminausschüttung zu einem Anstieg der Serumgastrinkonzentrationen (13, 14, 18, 103). Die Bedeutung der Hypergastrinämie bei der multifaktoriellen Ätiologie der Stressläsion ist noch unklar (37, 67). Diese wird als akuter erosiver oder ulzeröser Defekt der gastrointestinalen Mucosa während einer schweren organischen Stressituation klar definiert (37).

Nach Stress wurde bei der Ratte im Serum sowie im Magenfundus und Antrum ein Anstieg der Gastrinimmunreaktivität gefunden (57, 67). Durch trunkuläre Vagotomie konnte die Häufigkeit und die Schwere der Stressläsion gesenkt werden. Die protektive Wirkung der Vagotomie beruht auf einer Erhöhung des pH im Magen. Wie bereits beschrieben, findet sich nach Vagotomie eine zur Magensäuresekretion inverse Hypergastrinämie. Gastrin führt in physiologischen Konzentrationen an der denervierten Belegzelle zu keiner Mehrsekretion von Säure.

Bei der Untersuchung des Gastrinkomponentenmusters in der Mucosa von Fundus, Antrum und Duodenum der Ratte findet sich ein uniformes Bild (Abbildung 19 - 24). Es zeigt sich eine einzige Hauptkomponente, die an einer Position zwischen Gastrin-17 und Gastrin-34 eluiert wurde. Sie stellt in den untersuchten Magen- und Darmabschnitten ca. 90 % der gesamten Immunreaktivität dar. Der geringe Rest fand sich vor allem an der Position von Gastrin-17. Eine übereinstimmende Aussage stammt von Holmquist et al. (52). Aufgrund der Elutionsposition zwischen Gastrin-17 und Gastrin-34 wurde die Bezeichnung "intermediäres" Gastrin für diese Komponente gewählt.

Der Elutionsort dieses "intermediären" Gastrin kann durch ein geringeres Molekulargewicht im Vergleich zu Gastrin-34 bedingt sein. Eine andere Möglichkeit wäre, daß mehr Aminosäuren mit Phenolringen im Molekül eingebaut sind. Diese haben zum Chromatographiegel eine stärkere Affinität und verzögern somit die Elution, obwohl dieses Intermediär-Gastrin das gleiche Molekulargewicht wie Gastrin-34 haben kann (26).

"Component I" konnte nicht konstant nachgewiesen werden. Ebenso gelang es nicht, in den Gewebeproben Gastrin-14 eindeutig zu isolieren. Im Ausschlußvolumen wurde keine Immunreaktivität gefunden; es kann somit eine makromolekulare Gastrinkomponente in den Gewebsextrakten ausgeschlossen werden.

Der Befund eines fast ausschließlich aus der intermediären Komponente bestehenden Gewebsgastrin ist konträr zu den Ergebnissen, die man am Menschen erhält. Malmström et al. (76) und Creutzfeld et al. (21) konnten zeigen, daß das antrale Gewebsgastrin beim Menschen hauptsächlich auf Gastrin-17 entfällt. In diesem Zusammenhang ist es unwahrscheinlich, daß das humane Gewebsgastrin bei der Extraktionsprozedur von Gastrin-34 zu Gastrin-17 gespalten wird, da die Serum-Gastrinkomponenten auch bei wiederholtem Kochen stabil bleiben (91).

Bei der Ratte stimmt das Komponentenmuster im Serum nicht mit der Verteilung der Gastrinkomponenten im Gewebe überein (siehe Abbildung 18). In der Kontrollgruppe finden wir fast ausschließlich Gastrin-17 im Serum. Zwar wird auch eine relativ hohe Immunreaktivität im Ausschlußvolumen gemessen, da jedoch die Existenz einer makromolekularen Komponente unwahrscheinlich ist (siehe Einleitung), wurde dieser Befund bei der weiteren Diskussion außer acht gelassen.

Bei höheren Gastrinkonzentrationen - also bei Stress und nach Vagotomie - wurde zusätzlich das Intermediärgastrin gefunden. Dieser Befund kann als analog zu den Ergebnissen beim Menschen nach selektiv-proximaler Vagotomie gesehen werden, da man hier eine Mehrsekretion von Gastrin-34 findet.

"Component I" konnte im Serum nicht gefunden werden. Dagegen war Gastrin-14 in relativ hoher Konzentration vorhanden. Der "peak" konnte allerdings nicht sauber von Gastrin-17 getrennt werden.
Die inverse Beziehung zwischen Hypergastrinämie und verminderter Magensäuresekretion nach Vagotomie kann auch bei der Ratte nicht auf die Freisetzung von Gastrinkomponenten mit niedrigerer biologischer Aktivität bezogen werden, da Gastrin-17, das wir auch bei Ratte als die biologisch-aktive Komponente annehmen, in Absolutwerten nicht vermindert ist.
Die hier vorliegenden Ergebnisse machen deutlich, daß in der Magenmukosa der Ratte eine andere Verteilung der Gastrinkomponenten vorliegt als beim Menschen. Diese Tatsache allein schon läßt die Übertragung tierexperimenteller Befunde, z. B. nach Vagotomie, auf den Menschen wohl problematisch erscheinen.

Bei nahezu allen Peptidhormonen ist eine m o l e k u l a r e H e t e r o g e n i t ä t bekannt (80, 93, 95). Es wird angenommen, daß bei der Biosynthese in den Ribosomen zuerst die hochmolekularen, biologisch-inaktiven Hormonformen produziert und anschließend in den Zellgranula gespeichert werden. Bei der Freisetzung wird durch Abspaltung eines Peptidrestes die Vorstufe in die biologisch-aktive Form übergeführt (40).
Die erste nachgewiesene Hormonvorstufe war Proinsulin (80). Es kann neben dem Insulin und dem C-Peptid, dem abgespaltenen Peptidrest, im Serum gefunden werden. Die Spaltung in das biologisch aktive Insulin erfolgt durch Trypsin.
Die Hauptschwierigkeit, die Biosynthese von Gastrin in-vitro zu studieren, lag darin, daß man bisher noch keine geeigneten Präparationen antraler G-Zellen erhielt (44).

Für Parathormon wurde dieses Problem von Habener auf alternative Weise gelöst (46). Es gelang ihm, die messenger-RNA aus einem Adenom der Nebenschilddrüse und aus normalem Drüsengewebe zu isolieren. Die Translation studierte er in einem zellfreien System. Zuerst wurde ein großes Peptid, bestehend aus 115 Aminosäuren, gebildet, daß einem "pre-pro-PTH" entsprach. Dieses Peptid wurde rasch an einem basischem Aminosäurerest in ein kleineres Peptid, bestehend aus 90 Aminosäureresten gespalten. Dieses "pro-PTH" wiederum wurde in einer langsameren Reaktion in das biologisch-aktive PTH gespalten. Steiner (104) benutzte für Insulin dieselbe Methode und konnte ein "pre-pro-Insulin" in der Biosynthese dieses Hormones identifizieren.
Diese Resultate legen nahe, daß "Component I" die Stelle eines "pre-pro-Gastrins" zufällt analog den Befunden bei Insulin und Parathormon (87). Bei der in-vitro-Inkubation von "Component I" wird jedoch nur immunreaktives Material in der Größe von Gastrin-17 gefunden (89). Aber es könnte sein, daß Gastrin-34 als Zwischenstufe entsteht, aber sehr rasch durch Trypsin weitergespalten wird, so daß Gastrin-34 nicht akkumulieren kann. Die angenommene biosynthetische Sequenz ginge also von "Component I" über Gastrin-34 zu Gastrin-17. Der Nachweis eines N-terminalen "tryptischen Peptides" von Gastrin-34 in antraler Mucosa durch regionspezifische Antikörper unterstützt diese These (44). Immunzytologische Studien konnten Gastrin-17 und dieses N-terminale Fragment von Gastrin-34 in derselben Gastrinzelle lokalisieren (44). Diese Beobachtungen sind ein weiterer Indiz dafür, daß Gastrin-17 aus Gastrin-34 bereits in der G-Zelle entsteht. Bisher keinen Platz in dem biosynthetischen Schema fand man für Gastrin-14. Möglicherweise entsteht Gastrin-14 durch eine Nebenreaktion aus Gastrin-17.

In diesem Zusammenhang besteht eine gewisse Diskrepanz darin, daß Gastrin-34 im Serum rund 50 % der Immunreaktivität darstellt, während in der Antrummucosa nur 5 % der Immunreaktivität auf Gastrin-34 fallen (76). Diese Umverteilung der Serumkomponenten kann nicht allein durch die längere Halbwertszeit von Gastrin-34 erklärt werden. Die Halbwertszeit von Gastrin-17 beträgt 5 Minuten, für Gastrin-34 wird sie mit 42 Minuten angegeben (114). Nach Befunden an Gastrinompatienten ist eine überproportionale Freisetzung von Gastrin-34 aus den G-Zellen möglich (21, 22). Es erscheint beim Menschen unwahrscheinlich, daß Gastrin-34 während der peripheren Zirkulation aus Gastrin-17 gebildet wird, wie es Rehfeld et al. (92) nach Tierversuchen für möglich hielten. Die Herkunft des Gastrin-34 aus dem Duodenum konnte bisher nur bei antrektomierten Patienten nachgewiesen werden (65). Eine gute Korrelation besteht zwischen dem postprandialen Anstieg von Gastrin-17 im Serum und parallelem Abfall der antralen Konzentration von Gastrin-17. Nach Malmström und Stadil (75) stellt die hohe Konzentration von Gastrin-17 im Antrum einen Speicher dar für eine schnelle und effiziente Gastrinantwort auf einen physiologischen Stimulus. Der Abfall der antralen Gastrinkonzentration wird ca. 10 Minuten nach Instillation einer salinen Lösung gefunden. Die Neusynthetisierung von Gastrin beginnt sofort, so daß nach 20 - 30 Minuten bereits wieder die Ausgangswerte erreicht sind. Zu diesem Zeitpunkt wurde nach den hier vorliegenden Ergebnissen im Serum bereits ein Anstieg von Gastrin-34 gefunden (Abbildung 9). Gastrin-17 und Gastrin-34 scheinen also im Serum verschiedene Aufgaben zu besitzen. Gastrin-17 ist verantwortlich für die schnelle gastrininduzierte Säuresekretion nach einem Stimulus. Gastrin-34 mit seiner längeren Halbwertszeit vermittelt wahrscheinlich im Nüchternzustand die basale

Säuresekretion und inhibiert - nach einer Hypothese von Dockray (28) - die Freisetzung von Gastrin-17.
Im Serum und in Gewebeextrakten bei der Ratte bestehen nach den eigenen Ergebnissen umgekehrte Verhältnisse (Abbildung 18 - 21). Die Immunreaktivität im Gewebe entfällt hauptsächlich auf das großmolekulare "intermediäre" Gastrin. Eine der "Component I" entsprechende Immunreaktivität konnte weder im Serum noch in den Gewebeextrakten mit Sicherheit identifiziert werden. Möglicherweise wurde auch der untersuchte Mukosaextrakt vor der Chromatographie zu hoch verdünnt, so daß der Nachweis einer in nur niedriger Konzentration vorhandenen Gastrinkomponente nicht mehr möglich war. Im Rattenserum finden wir eine dem Gastrin-17 und Gastrin-14 entsprechende Immunreaktivität. Die großmolekularen Hormonformen werden bei der Ratte in den Vesikeln der Gastrinzelle gespeichert und bei der Freisetzung durch ein proteolytisches Enzym in die aktive Hormonform gespalten. Rehfeld und Uvnäs-Wallensten (86, 110, 11) sowie Dockray et al.(28) fanden bei Untersuchungen an Katzen bzw. Hunden ähnliche Verhältnisse. Die Immunreaktivität in den antralen G-Zellen besteht neben Gastrin-17 aus "Component I" und Gastrin-34. Nach elektrischer Vagusstimulation wird aber ausschließlich Gastrin-17 freigesetzt. Daraus entsteht während der peripheren Zirkulation Gastrin-14. Die Autoren nehmen an, daß Gastrin-17 bereits intrazellulär aus "Component I" und Gastrin-34 entsteht (80). Diese Befunde sprechen somit ebenfalls für die oben beschriebene biosynthetische Sequenz.

Die molekulare Heterogenität besitzt auch Bedeutung für die k l i n i s c h e G a s t r i n b e s t i m m u n g .
In Abbildung 8 konnte gezeigt werden, daß mit dem Antiserum 4562 "Component I" und Gastrin-34 niedriger gemessen werden als mit Antiserum 2604. DeMagistris und Rehfeld (74) erhielten für diese beiden Antiseren ein identisches Ergebnis. Antiserum 4562 bindet Gastrin-34 nur zu etwa 70 %,

während Gastrin-Antiserum 2604 mit allen Gastrinkomponenten äquipotent kreuzreagiert. Da das radioimmunologisch zu bestimmende Serumgastrin aus einem heterogenen Hormongemisch besteht, werden mit Antiseren, die mit den großmolekularen Gastrinkomponenten schwächer kreuzreagieren, verständlicherweise falsch niedrige Serumkonzentrationen gemessen. Dies zeigte sich auch bei der Erstellung des Normalbereiches für Serumgastrin mit dem Antiserum 4562 (angegeben als $\bar{X} \pm SEM$, $n = 70$). Der Mittelwert lag mit diesem Antiserum nur noch bei $31 \pm 1{,}7$ pg/ml, während mit dem Antiserum 2604 ein Mittelwert von $42 \pm 2{,}4$ pg/ml gemessen wurde.

Da in den einzelnen Laboratorien, die den Gastrinradioimmunoassay durchführen, verschiedene Antiseren verwenden, die nicht standardisiert sind, bestehen zwischen den von den einzelnen Arbeitsgruppen angegebenen Normalbereichen erhebliche Unterschiede (4). Daraus wird auch verständlich, daß bei Verwendung eines Antiserums mit schwacher Kreuzreaktion gegenüber Gastrin-34 eine Grenzwerthypergastrinämie, wie bei der antralen G-Zellhyperplasie, nicht erfaßt wird, da bei dieser Patientengruppe das basale Serumgastrin zu mindestens 50 % aus Gastrin-34 besteht (siehe Abbildung 14). Für die Charakterisierung eines Gastrinradioimmunassays ist also zu fordern, daß die Bindungsfähigkeit des verwendeten Antiserums für die einzelnen Gastrinkomponenten mit Hilfe der Gelchromatographie oder anderer Techniken untersucht wird.

F. ZUSAMMENFASSUNG

1. Mit Hilfe der Säulengelchromatographie wurden in hypergastrinämischen Seren von Patienten mit Zollinger-Ellison Syndrom oder chronisch-atrophischer Gastritis die vier Hauptkomponenten von Gastrin identifiziert. Dazu mußte durch Verlängerung der Inkubationszeit bei höherer Verdünnung des Antiserums die untere Nachweisgrenze des Radioimmunoassays verbessert werden. Es konnte gezeigt werden, daß Albumin eine unspezifische Interferenz im Radioimmunoassay verursacht; somit muß eine Immunreaktivität im "void-volume" der Chromatographiesäule als Artefakt angesehen werden.

2. Im Serum magengesunder Probanden zeigt sich unmittelbar postprandial ein Anstieg von Gastrin-17. Die weitere Interpretation ist wegen der niedrigen Gastrinkonzentration schwierig. Bei Patienten mit Ulcus duodeni wird eine vermehrte Freisetzung des biologisch-aktiveren Gastrin-17 postprandial als Ursache der höheren Säuresekretion ausgeschlossen; es zeigt sich vielmehr eine geringe Zunahme von Gastrin-34.

3. Eine Vagotomie verändert langfristig die Zusammensetzung der Serumgastrinkomponenten. Der Hauptteil der Immunreaktivität entfällt auf Gastrin-34; dieses steigt vor allem postprandial weiter an.

4. Bei der antralen G-Zellhyperplasie sind im Serum die vier Hauptkomponenten nachweisbar. Im Nüchternserum überwiegt Gastrin-34; die unmittelbar postprandiale Gastriantwort erfolgt jedoch durch Gastrin-17.

5. Der Gastrinkatabolismus ist bei der chronischen Niereninsuffizienz vermindert, sodaß im Serum vor allem die großen Molekülformen akkumulieren.

6. Im Gegensatz zum Menschen besteht bei der Ratte das Gewebsgastrin fast ausschließlich aus einer großmolekularen Komponente, die zwischen Gastrin-34 und Gastrin-17 eluiert wird. Sie wird in dieser Arbeit als "intermediäres" Gastrin bezeichnet. Diese stellt wahrscheinlich wie "Component I" und Gastrin-34 beim Menschen eine Hormonvorstufe in der biosynthetischen Sequenz dar. Stress und Vagotomie verändern die Zusammensetzung der Gastrinkomponenten in der gastrointestinalen Mucosa bei der Ratte nicht; im Serum kann nach Vagotomie neben Gastrin-17 auch das "intermediäre" Gastrin nachgewiesen werden.

3. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ardill, J.: Radioimmunoassay of gastrointestinal hormones. Clinics in Endocrinology and Metabolism 8 (1979), 270 - 278.

2. Arnold, R. Becker, H. D., Koop, H., Schwarting, H., Creutzfeld, W.: Antral G- and D-cell density in patients with antral G-cell hyperfunction. International Symposium on Brain-Gut- Axis: The New Frontier.Florenz 29.6. - 10.7.1980.

3. Arnold, R., Koop, H., Creutzfeld, W.: Endokrinologische Aspekte der Ulkuspathogenese.In: Pathogenese und Therapie des Ulkus. K.-H. Holtermüller, J.-R. Malagelada,D.Henog (Hrsg.).Excerpta Medica; Amsterdam, Oxford, Princeton S. 147 - 159 (1981).

4. Arnold, R., Fritsch, W.-P., Londong W., Schafmeyer, A., Schusdziarra, V.: Expertengruppe Gastrointestinale Hormone. In: Hormonbestimmungen in der Klinik: Derzeitiger Stand und zukünftige Entwicklung. R. Knuppen (Hrsg.). Endokrinologie - Informationen 3 , 96 - 98 (1980).

5. Bauer, H., Arnold, R., Track, N. S., Creutzfeld, W., Holle, F.: Einfluß der selektiv proximalen Vagotomie mit oder ohne Pyloroplastik auf die basale und postprandiale Gastrinfreisetzung bei Ulcus-duodeni-Patienten. Klin. Wschr. 53, 209- 214 (1975).

6. Becker, H. D., Reeder, D. D., Thompson,J.C.: Extraction of circulating endogenous gastrin by the small bowel . Gastroenterology 65, 903 - 906 (1973).

7. Becker, H. D.: Differentialdiagnose der Hypergastrinämie Magenkrankheiten: Diagnostische und therapeutische Aspekte. ed: Domschke W., Wormsley, K.G.(Hrsg.). Thieme-Verlag, Stuttgart- New York; S. 210 - 219 (1981).

8. Becker, H.D.: Methodische Fortschritte in der Funktionsdiagnostik des Magens: Magensekretionsanalyse, intragastrale Titration, endokrine Provokationstests. Z. Gastroenterol. 16, 118 - 125 (1978.)

9. Von Berger L., Raptis, S., Dollinger, H., Pfeiffer, E.F.: Eine standardisierte Methode zur physiologischen Gastrinstimulation. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 80, 513 - 515 (1974).

10. Bösl, F.: Klinische Bedeutung der radioimmunologischen Gastrinbestimmung für die Ulkuskrankheit. Inauguraldissertation, Ludwig-Maximilians-Universität. München (1980).

11. Bonfils S., Mignon, M., Rosé, C.: Vagal control of gastric secretion.In: Gastrointestinal Physiology, Vol 19. R.Y.Crane (Hrsg.).University Park Press, Baltimore; S. 170 - 195 (1979).

12. Brady, P. G., McGuigan, J. E.: Molecular species of gastrin in the serum of normal individuals and duodenal ulcer patients. Gastroenterology 68, 195 (1975).

13. Brandsborg, O., Christensen, N. J., Brandsb rg, M., Løvgreen, N. A.: Plasmacatheccholamines and the regulation of gastrin secretion in man.In: Gastrins and the vagus. J.F.Rehfeld, E.Amdrup (Hrsg.). Academic Press, London, New York, San Francisco; S. 295 - 298 (1979).

14. Brandsborg, O., Brandsborg, R., Christensen, N. J.: Plasma adrenalin and serum gastrin: Studies in insulin-induced hypoglykemia and after adrenalin infusions. Gastroenterology 68,455 - 460 (1975).

15. Brewer, J. M., Pesce, A. J., Ashworth, R.B.: Gelfiltration. In: Experimentelle Methoden in der Biochemie . Gustav Fischer-Verlag; Stuttgart-New York, S. 40 - 47 (1977).

16. Burr, J. R., W. Stauffacher, Balant, L., Renold, A.E., Grodsky G., M.: Dynamic aspects of proinsulin release from the perfused rat pancreas. Lancet II, 882 (1969).

17. Calam, J., Dockray, G.J., Walker, R., Tracy, H. J., Owens, D.: Molecular forms of gastrin in peptic ulcer: comparison of serum and tissue concentrations of G-17 and G-34 in gastric and duodenal ulcer subjects. Eur. J. of Clin. Invest. 10, 241 - 247 (1980).

18. Christensen, K. S., Stadel F.: Effect of epinephrine and norepinephrine on gastrin release and gastric secretion of acid in man. Scand. J. Gastroent., Suppl. 37, 87 - 92 (1973).

19. Clendinnen B. G., Reeder, D.D., Brandt, F., N. jr., Thompson, J. C.: Effect of nephrectomy on the rate and pattern of the disappearance of exogenous gastrin in dogs.Gut 14,462 - 467 (1973).

20. Creutzfeld, W., Arnold, R.: Endocrinology of duodenal ulcer. World J. Surgery 3,605 - 613 (1979).

21. Creutzfeld, W., Arnold R., Creutzfeld C., Track, N.S.: Mucosal gastrin concentration, molecular forms of gastrin, number and ultrastructure of G-cells in patients with duodenal ulcer. Gut 17,745 - 754 (1976).

22. Creutzfeld, W., Arnold R., Creutzfeld, C., Track, N.S.: Pathomorphologic, biochemical and diagnostic aspects of gastrinomas (Zollinger-Ellison Syndrome). Hum. Path. 6, 47 - 76 (1973).

23. Davidson W. D., Moore, Th. C., Shippey, W., Conovaloff, A. J.: Effect of bilateral nephrectomy and bilateral ureteral ligation on serum gastrin levels in the rat. Gastroenterology 66, 522 - 525 (1974).

24. Debas, H. T., Walsh, J.H., Grossmann, M.J.: Pure human minigastrin: secretory potency and disappearance rate. Gut 15, 686 - 689 (1974).

25. Denker, F., Rehfeld, J., Stadil, F.: Immunoreactive gastrin in portal and peripheral venous blood during and after feeding in man. Gut 14, 856 - 860 (1973).

26. Determann, H.: Gelchromatographie. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, New York (1967).

27. Deveney, C.W., Deveney, K.S., Jaffe, B.M., Jones, R.S., Way, L.W.: Use of calcium and secretin in the diagnosis of gastrinoma (Zollinger-Ellison syndrome) Ann. Intern. Med. 87,680 - 686 (1973).

28. Dockray, G. J., Debas, H. T., Walsh J.H., Grossman, M.J.: Molecular forms of gastrin in antral mucosa and serum of dogs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149, 550 (1975).

29. Dockray, G.J.: Gastrin overview.In: Gut Hormones. S.R.Bloom (Hrsg.).Churchill Livingston Press,Edingburgh, London, New York; S. 129 - 139 (1978).

30. Dockray, G.J., Taylor, J.L.: Heptadecapeptide gastrin: measurement in blood by specific radioimmunoassay. Gastroenterology 71, 971 - 977 (1976).

31. Dockray, G,J., Taylor, J.L.: Different forms of gastrin in peptic ulcer.In: Gastrointestinal hormones and pathology of the digestive System . M. Grossmann(Hrsg.) Plenum Press, New York, London; S.91 - 96 (1978).

32. Dockray, G.J., Walsh, J.H.: Amino terminal gastrin fragment in serum of Zollinger-Ellison syndrome patients. Gastroenterology.68,222 - 230 (1975).

33. Erhardt, F., Marschner, J., Pickardt, R.C., Scriba, P.C.: Verbesserung und Qualitätskontrolle der radioimmunologi - schen Thyreotropin-Bestimmung. Z. klin. Chemie klin. Bioch. 11,381 - 387 (1973).

34. Evans, J., Reeder, D., Becker, H., Thompson, J.: Extraction of circulating endogenous gastrin by the gastric fundus. Gut, 15,112 - 155 (1974).

35. Feldman, M., Richardson, C.T., Taylor, J.L., Walsh, J.M.: Effect of atropine on vagal release of gastrin and pancreatic polypeptide. J. Clin. Invest. 63,294 - 298 (1979).

36. Fordtran J.S., Walsh, J.H.: Gastric acid secretion rate and buffer content of the stomach after eating: results in normal subjects and in patients with duodenal ulcer. J. Clin. Invest. 52,645 - 657 (1973).

37. Fritsch, W.P., Scholten,Th., Müller J., Hengels, K.J.: Pathogenese der Stressläsionen.In: Stressläsionen im Magen-Darm-Trakt. E. Götz (Hrsg.). G. Thieme-Verlag, Stuttgart, New York; S. 1 - 11 (1981)

47. Hällgren, R., Karlsson, F.A., Lundquist, G.: Serum level of immunoreactive gastrin: influence of kindey function. Gut 19, 207 - 213 (1978).

48. Hansky, J., King, R.W.F.: Effect of atropine on food-stimulated gastrin release after truncal vagotomy in man. Gastroenterology 73, 205 - 206 (1977).

49. Hansky, J., King, R.W., Holdsworth, S.: Serum gastrin in chronic renal failure. In: Gastrointestinal Hormones. J.C.Thompson(Hrsg), University of Texas Press,Austin London; S. 115 - 124 (1975).

50. Hansky, J., Korman, M.G.: Immunoassay studies in peptic ulcer. Clinics in Gastroenterology 2, 275 - 291 (1973).

51. Hjelmquist, U.B.E., Reeder, D.D., Brandt, E.N. jr., Thompson, J.C.: Effect of the kidney on endogenous gastrin. Surg. Forum 23, 318 - 320 (1974).

52. Holmquist, A.L., Walsh, J.H., Feldman, E.J.: Immuno-chemical distinction between rat gastrin and other mammalian gastrins. Gastroenterology 72, 1071 (1977).

53. Hughes, W., Hernandez, A.: Antral gastrin concentration in patients with vagotomy and pyloroplasty. Gastroenterology 71, 720 - 725 (1976).

54. Hunter, W.M., Greenwood, F.C.: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature 194, 495 - 496 (1962).

55. Isenberg, J.I., Grossman, M.J., Maxwell, V. et al : Increased sensitivity to stimulation of acid secretion by pentagastrin in duodenal ulcer. J. Clin. Invest. 55, 330 - 337 (1975).

38. Gallenberger S.: Untersuchungen über die molekulare und immunologische Heterogenität von Wachstumshormon Inaugural Dissertation, Ludwig- Maximilians-Universität München (1976).

39. Ganguli, P.C., Polak, J.M. Pearse, A.G.E. e.a.: Antral-gastrin-cell hyperplasiain peptic ulcer disease Lancet I, 583 - 586 (1974).

40. Gregory, R.A., Tracy, H.J.: Isolation of two "big gastrins" from ZES tumor tissue. Lancet II, 797 - 799 (1972).

41. Gregory, R.A.: Heterogeneity of the gastrins in blood and tissue. Ciba Found. Symp. 41, 251 - 260 (1976).

42. Gregory, R.a.: The gastrins: structure and heterogeneity in: Gastrointestinal hormones and the pathology of the digestive system. M.Grossman (Hrsg.). Plenum Press, New York, London; S. 75 - 84 (1978).

43. Gregory, R.A., Tracy, J.: Isolation of two "mini Gastrins" from ZES tumor tissue. Gut 15, 683 - 685 (1974).

44. Grossman, M.J.: Physiology and pathophysiology of gastrin. Clinics in Gastroent. 3, 530 - 538 (1974).

45. Grossman, M.J.: Vagal stimulation and inhibition of acid secretion and gastrin release: which aspects are cholinergic ? In: Gastrins and the Vagus. J.F.Rehfeld,E.Amdrup (Hrsg.). Academic Press, London, New York, San Francisco; S. 105 - 112 (1979).

46. Habener, J. F.: New concepts in the formation, regulation of release, and metabolism of parathyroid hormons. Ciba Found. Symp. 41 (new series), 197 - 224 (1976).

56. Isenberg, J.J., Walsh, J.H., Grossman, M.I.: Zollinger-Ellison-Syndrome. Gastroenterology 65, 140 - 165 (1973).

57. Keller, M.: Der Einfluß trunkulärer Vagotomie auf die spezifische Histidindekarboxylase und auf Gastrin im Rattenmagen. Inaugural-Dissertation Ludwig- Maximilians-Universität München (1979)

58. Klewar, G.: Methodik und Anwendung der radioimmunologischen Gastrinbestimmung. Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1978).

59. Korman, M.G., Soveny, C., Hansky, J.: Paradoxical effect of secretin on serum immunreactive gastrin in the Zollinger-Ellison-Syndrome. Digestion 8, 407 - 416 (1973).

60. Korman, M.G., Hansky, J., Scott, P.R.: Serum gastrin in duodenal ulcer. Part III: Influence of vagotomy Gut 13, 39 - 42 (1972).

61. Korman, M.G., Hansky, J., Cumberland, H., Coupland, A.E.: Serumgastrin in duodenal ulcer. Part IV: Effect of selective gastric vagotomy Gut 13, 163 - 1965 (1972).

62. Kuku, S.F., Jaspan , J.B., Emmanonunel, D.S., Zeidler, A., Katz A.I., Rubinstein, A.H.: Heterogeneity of plasma glucagon: circulating components in normal subjects and patients with chronic renal failure. J. Clin. Invest. 58, 742 - 751 (1976).

63. Lamers, C.B., van Tongeren, J.H.: Comparative study of value of the calcium secretin, and meal stimulated increase in serum gastrin to the diagnosis of the Zollinger-Ellison syndrome Gut 18, 128 - 134 (1977).

64. Lamers, C., Harrison, A., Ippoliti, A., Walsh, J.: Molecular forms of circulating gastrin in normal subjects and duodenal ulcer patients. (Abstract). Gastroenterology 76, 1179 (1980).

65. Lamers, C.B., Walsh, J.H., Jansen, J.B., Harrison, A.R., Ippoliti, A.F., van Tongeren, J.H.: Evidence that Gastrin-34 is preferentially released from the human duodenum. Gastroenterology 83, 233 - 239 (1982).

66. Londong W., Büchler, M., Forssmann, W. G., Helmstädter, V.: Antrale G-Zell-Hyperplasie: kein tumorähnlicher Befund. Fortschritte der gastroenterol, Endoskopie 11, 100 - 104 (1979).

67. Londong, W., Keller, M., Feifel, G.: Einfluß von Stress auf Serum- und Gewebsgastrin der vagotomierten Ratte. Dtsch. Ges. inn. Med. 85, 138 (1979).

68. Londong, W., Birkmeier, E., Feifel, G., Forssmann, W.G., Helmstädter, V., Zumtobel, V.: Antrale G-Zell-Hyperplasie - Eine wichtige Differentialdiagnose für die chirurgische Therapie des Zollinger-Ellison-Syndroms. In: Fortschritte der endokrinologischen Chirurgie. M. Rothmund, F. Kümmerle (Hrsg.). Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart-New York, S. 79 - 88 (1981).

69. Londong, W., Klewar, G., Londong, V., Forell, M.M.: Automatisierbare Methode der radioimmunologischen Bestimmung von Gastrin. II. Verhandlung der Ges. für Gastroenterologie in Bayer (1974).

70. Londong, W., Feifel, G., Bösl, F., Wagner, S., Zumtobel, V., Forell, M.M.: Basal and stimulated gastrin release in selective proximal vagotomized patients. Acta Endocr. (KbH.) Suppl. 199, 373 (1975).

71. Londong, W., Londong, V.: Differentialtherapie der komplizierten gastroduodenalen Ulkuskrankheit. Schwerpunkt Medizin 4, 27 - 32 (1980).

72. Londong, W., Birkmeier, E., Bösl, F., Helmstädter, V.: Bedeutung der prae- und postoperativen Gastrindiagnostik für die Ulkuschirurgie. In: Nicht-resezierende Ulkuschirurgie. H.Bauer (Hrsg.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S.79 - 88 (1980).

73. Lundquist G., Hällgren, R., Landelins, J. , Fjellström, K.L.: Further studies on plasma immunoreactive gastrin in uremia. Scand. J. Gastroent. 13, Suppl. 49, 117 (1978).

74. DeMagistris, Rehfeld: A simple enzymatic procedure for radioimmunochemical quantitation of the large molecular form of gastrin and cholezystokinin. Analytical Biochemistry 102, 126 - 133 (1980).

75. Malmström, J., Stadil, F.: Gastrin content and gastrin release. Scand. J. Gastroent. Suppl. 37, 71 - 76 (1976).

76. Malmström, J., Stadil, F., Rehfeld, J.F.: Gastrins in tissue: Concentration and component pattern in gastric, duodenal and jejunal mucosa of normal human subjects and patients with duodenal ulcer. Gastroenterology 70, 697 - 703 (1976).

77. Malmstrøm, J., Stadil, F., Christensen, K.: Effect of truncal vagotomy on gastroduodenal content of gastrin. Br. J. Surg. 64, 34 - 38 (1977).

78. Marschner, I., Erhard, F. Scriba, P.C.: Calculation of the radioimmunoassay standard curve by "spline function". In: Radioimmunoassay and related procedures in medicine. Internat. Atomic Energy Agency, Wien, S. 111 - 122 (1974).

79. McGuigan, J.E., Trudeau, W.L.: Serum gastrin levels before and after vagotomy and pyloroplasty or vagotomy and antrectomy. N. Eng. J. Med. 286, 184 - 188 (9172).

80. Melani, F:: Prohormones in tissues and in circulation. Horm. Metab. Res. 6, 1 - 8 (1974)

81. El Munshiid, H., A., Hakanson, R., Liedberg, G., Rehfeld, J.F., Sundler, F.: Importance of the kidneys for gastrin elimination and gastric function. J. Physiol. 299, 157 - 177 (1980).

82. Nielsen, H.E., Christensen, C.K., Brandsborg, M., Brandsborg, O.: The effect of renal transplantation on basal serum gastrin concentration. Acta Med. Scand. 207, 85 - 87 (1980).

83. Nilsson, G.: Gastrin: Isolation, characterization, and functions. In:Gastrointestinal hormones. G.B.J.Glass (Hrsg.). Raven Press, New York; S. 127 - 167 (1980).

84. Pearse, A.G.E., Takor Takor T.: Neuroendocrine embryology and the APUD concept. Clin. Endocrinol. 5, Suppl.,229 - 234 (1976).

85. Petersen, B., Henriksen, J.H., Rehfeld, J.F., Christiansen, J.: Removal of endogenous gastrin in man. Scand. J. Gastroent. 16, 727 - 730 (1981).

86. Rehfeld, J., Uvnäs-Wallensten, K.: Gastrins in cat and dog: Evidence for a biosynthetic relationship J. Physiol 283 , 379 - 396 (1978).

87. Rehfeld, J.F.: Progastrin and larger molecular forms of gastrin.In: Endocrinology,Vol I. V.H.T.James (Hrsg.). Elsevier, New York; S. 57 - 60 (1976).

88. Rehfeld, J.F., Larsson, L.J.: The predominating antral gastrin and intestinal cholezystokinin is the common COOH-terminal tetrapeptide amide. In: Gastrins and the vagus . J.F.Rehfeld, E.Amdrup (Hrsg.). Academic Press, London, New York, San Francisco; S. 85 - 94 (1979).

89. Rehfeld, J.F., Stadil, F.: Gel filtration studies on immunoreactive gastrin in serum from ZES-patients. Gut 14, 369 - 373 (1973).

90. Rehfeld, J.F., Stadil, F., Rubin, B.: Production and evaluation of antibodies for the radioimmunoassay of gastrin. Scand. J. clin. Lab. Invest. 30, 221 - 232 (1972).

91. Rehfeld, J.F., Stadil, F., Vikelsøe, J.: Immunoreactive gastrin components in human serum. Gut 15, 102 - 111 (1974).

92. Rehfeld, J.F., Stadil, F., Schwartz, T.W., Christiansen, L., Malmström, J.: Heterogeneity of gastrin with reference to conversion of heptadecapeptide gastrin. Clin. Endocrinol. Suppl. 5, 185 - 193 (1976)

93. Rehfeld, J.F.: Gastrointestinal Hormones. Gastrointestinal Physiology III, Volume 19, University Park Press Baltimore; S. 293 - 321 (1979).

94. Rehfeld, J.F.: Review: Gastrins in Serum. Scand. J. Gastroenterology 8, 577 - 583 (1973).

95. Rehfeld, J .F.: Heterogeneity of gastrointestinal Hormones. In: Gastrointestinal Hormones. G.B.J.Glass (Hrsg.). Raven Press, New York; S. 433 - 439 (1980).

96. Rehfeld, J.F., Schwartz, T.W., Stadil, F.: Immunochemical studies on macromolecular gastrins. Gastroenterology 73, 469 - 477 (1977).

97. Rehfeld, J.F., Stadil, F., Malmström, J., Miyata, M.: Gastrin heterogencity in serum and tissue: a progress report. In: Gastrointestinal Hormones. J.C.Thompson (Hrsg.). University of Texas Press, Austin, S. 43 - 58 (1975).

98. Schacht, U., Fritsch, W.-P., Rumpf, T., Jacobs, G., Hausamen, T.-U.: Stimulation der H+-Sekretion und des Serum-Gastrins durch intraoperative elektrische Vagusreize vor und nach PSV. Dtsch. med. Wschr. 102, 894 - 896 (1977).

99. Stadil, F., Rehfeld, J.F., Christiansen, L.A., Malmström, J.: Patterns of gastrin components in serum during feeding in normal subjects and duodenal ulcer patients. Scand. J. Gastroent. 10, 863 - 868 (1975).

100. Stadil, F., Rehfeld, J.F.: Determination of gastrin in serum. Scand. J. Gastroent. 8, 101 - 112 (1973).

101. Stadil, F., Malmstrøm, J., Christensen, K.: The vagus and gastrin components in peripheral blood. Scand. J. Gastroent., Suppl. 37, 77 - 80 (1976).

102. Stadil, F., Stage, J.G.: The Zollinger-Ellison Syndrom. Clinics in Endocrinology and Metabolism 8, 433 - 445 (1975).

103. Stadil, F., Rehfeld, J.F.: Release of gastrin by epinephrine in man. Gastroenterology 65, 210 - 215 (1973).

104. Steiner, D.F.: Biosynthesis of insulin and glucagon: a view of the current state of the art. Ciba Found. Symp. 41 (new series), 7 - 30 (1976).

105. Stockbrügger, R., Larsson, L.I., Lundqvist, G., Angervall, L.: Antral gastrin cells and serum gastrin in achlorhydria. Scand. J. Gastroent. 12, 209 - 213 (1977).

106. Straus, E., Gierson, C.D., Yalow, R.S.: Hypersecretion of gastrin associated with the short bowel syndrome. Gastroenterology 66, 175 - 190 (1974).

107. Sullivan, S.N., Tustanoff, E., Slaughter, D.N. e. a.: Hypergastrinemia and gastric acid hypersecretion in uremia. Clinical Nephrology 5, 25 - 32 (1976).

108. Strunz, Z.T., Thompson, M.R., Elshoff, J., Grossman, M.J.: Hepatic inactivation of gastrins of various chain lengths in dogs. Gastroenterology 74, 550 - 553 (1978).

109. Thompson, J.C., Rayford, Ph., L., Ramos, N.J., Fender, H.R., Villar, H.V.: Patterns of release and uptake of heterogeneous forms of gastrin. In: Gastrointestinal Hormones . J.C.Thompson (Hrsg.).University of Texas Press, Austin, London; S. 125 - 151 (1975).

110. Uvnäs-Wallenstein, K., Rehfeld, J.F.: Molecular forms of gastrin in antral mucosa, plasma and gastric juice during vagal-stimulation of anesth tized cats. Acta physiol Scand. 98, 217 - 226 (1976).

111. Uvnäs-Wallenstein, V.: Occurence of astrin in gastric juice, in antral secretion and in antral perfusates of cats. Gastroenterology 73, 487 - 491 (1977).

112. Valenzuela, J., Walsh, J.H., Isenberg, J.J.: Effect of gastrin on pancreatic enzyme secretion and gallbladder emptying in man. Gastroenterology 71, 409 (1976).

113. Walsh, J.H., Richardson, C.T., Fordtran : pH dependence of acid secretory and gastrin release in normal and ulcer subjects. J. Clin Invest 55, 462 - 468 (1975).

114. Walsh, J.H., Isenberg, J.J., Ansfield, J., Maxwell, V.: Clearance and acid-stimulating action of human big and little gastrins in DU patients. J. Clin Invest 57, 1125 - 1130 (1976).

115. Walsh, J.H., Yalow, R.S., Berson, S.A.: The effect of atropine on plasma gastrin response to feeding. Gastroenterology 60, 16 - 21 (9171).

116. Walsh, J.H. Grossmann, M.J.: Gastrin part I/ part II,
117. N. Engl. J. Med. 292, 1324 ff. und 1377 ff. (1975).

118. Walsh, J.H., Lam S.K.: Physiology and pathology of gastrin. Clinics in Gastroenterology 9, 567 - 590 (1980).

119. Walsh, J.H.: Pathogenetic role of the gastrins in "Gastrins and the Vagus". J.F.Rehfeld,E.Amdrup (Hrsg.). Academic Press, London, New York, San Francisco; S. 181 - 198 (1979).

120. Walsh, J.H., Debas, H.T., Grossmann, M.J.: Pure human big gastrin: immunochemical properties, disappearance half time, and acid-stimulating action in dogs. J. Clin. Invest. 54 , 477 - 485 (1974).

121. Wesdorp, R.J.C., Falcao, H.B., Funovics, J.M., Fischer, J.E.: Verhalten von Gastrin und Magensäuresekretion bei akutem und chronischem Nierenversagen vor und nach Nierentransplantation. Langenbecks Archiv f. Chirurgie, Suppl. , 216 - 219 (1976).

122. Walsh, J.H., Grossman, M.J.: Circulating gastrin in peptic ulcer disease. Mt. Sinai J. Med. 40, 347 - - 381 (1973).

123. Yalow, R.S. Berson, S.A.: Radioimmunoassay of gastrin. Gastroenterology 58, 1 - 14 (1971).

124. Yalow, R.S., Wu, N.: Additional stduies on the nature of big, big gastrin. Gastroenterology 65, 19 - 27 (1973).

125. Yalow, R.S., Berson, A.: Further studies on the nature of immunoreactive gastrin in human plasma. Gastroenterology 60, 203 - 209 (1971).

126. Yalow, S., Berson, S.A.: Size and Charge Distinctions between endogenous human plasma gastrin in peripheral blood and heptadecapeptide gastrin . Gastroenterology 58, 609 - 619 (1970).

127. Yamagat, S., Ishimori, A., Sakuran, H.: Role of the kidney in gastrin metabolism. Tohoku J. exp. Med.118, 45 - 51 (1976).

128. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala: "Sephadex Gelfiltration in Theory and Practice". (1974).

129. Bio-Rad Laboratories: Materials, Equipment and Systems for Chromatography, Electrophoresis, Immunochemistry and Membrane Filtration. Catalogue C, March 1977.

Ergebnisse der vorliegenden Dissertation gingen in folgende Veröffentlichungen ein:

Londong, W., Birkmeier, E., Bösl, F., Helmstädter, V.: Bedeutung der prae- und postoperativen Gastrindiagnostik für die Ulcuschirurgie. In: Nicht-resezierende Ulcuschirurgie. H.Bauer (Hrsg.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York; S. 79 - 88 (1980).

Londong, W., Birkmeier, E., Feifel, G.,Forssmann, W.G., Helmstädter, V., Zumtobel, V.: Antrale G-Zellhyperplasie - Eine wichtige Differentialdiagnose für die chirurgische Therapie des Zollinger-Ellison-Syndroms. In: Fortschritte der endokrinologischen Chirurgie. M. Rothmund, F. Kümmerle (Hrsg.). Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, New York; S. 79 - 88 (1981).

Londong, W., Birkmeier, E., Feifel, G., Junginger, Th., Forell, M.M.: Langzeiteffekte der Vagotomie (SPV) auf das Serumgastrin. In: Ergebnisse der Gastroenterologie 1977. W. Creutzfeldt, M. Classen (Hrsg.). Demeter-Verlag, Gräfelfing; Abstr. 5 (1978).

Für die Überlassung des Themas bin ich Herrn Priv. Doz. Dr. med. W. Londong zu besonderem Dank verpflichtet. Seine großzügige Hilfestellung und kollegiale Kritik trugen wesentlich zum Gelingen der Arbeit bei.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen, Frl. C. Ruthe und Frl. B. Greiner, danke ich für ihre zahlreichen Hilfeleistungen.

Herrn Dipl. Math. M. Bauer und Frau H. Beranek von der EDV-Abteilung danke ich für die Auswertung sämtlicher Gastrin-Radioimmunoassays.

Mein Dank gilt insbesondere auch meinen Mitdoktoranden Herrn Dr.med. F. Bösl und Frau Dr. med. M. Keller, auf deren Untersuchungen und Ergebnisse ich meine Arbeit aufbaute.

Nicht zuletzt danke ich Frau I. Wiktorin und Fräulein F. Haag für das Zeichnen der Abbildungen und für die photographischen Arbeiten.

LEBENSLAUF

Am 29. November 1951 wurde ich als zweites Kind des Malermeister Josef Birkmeier und seiner Ehefrau Maria, geb. Baumüller, in Augsburg geboren.

Ich besuchte von 1958 bis 1963 die Volksschule in Mering und anschließend das Humanistische Gymnasium St.Stephan in Augsburg. Nach der Reifeprüfung 1972 leistete ich meinen Grundwehrdienst ab.

Im Sommersemester 1974 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München das Medizinstudium, das ich im Mai 1980 mit dem Staatsexamen und mit der Approbation abschloß.

Seit August 1980 arbeite ich als Assistenzarzt in der Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen des Deutschen Herzzentrums München.

Seit 23.12.1982 bin ich mit Helga Birkmeier, geb. Veitenhansl, verheiratet.